



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

---

## Analyse du microsymbiote isolé à partir des racines de la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev.

---

Présenté et soutenu par : *Menadi Oualid*  
*Boumaza Adam*

Le : 13/06/2016

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** *Riah Nassira* (maitre de conférences « B » - UFM Constantine).

**Rapporteur :** *Chabbi Rabah* (maitre-assistant « A » - UFM Constantine).

**Examineurs :** *Benkahoul Malika* (maitre de conférences « B » - UFM Constantine).

*Année universitaire*  
*2015 - 2016*

## *Remerciements*

Nous voudrions avant toute chose remerciée ALLAH le tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance et nos remerciements en premier lieu à notre encadreur Mr. Chabbi Rabeh Pour l'aide et conseils qu'il nous a apporté durant toute la période pendant laquelle notre travail a été mené.

Un grand merci aux membres du jury: Mme Riah Nassira maitre de conférences «B» a U.F.M constantine et Mme Benkahoul Malika maitre de conférences «B» a U.F.M constantine d'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nous voudrions également exprimer nos remerciements à toute l'équipe pédagogique aussi que tous les intervenants professionnels responsables de la formation Pour avoir assurer tous les supports nécessaires (pédagogiques et matériels) pour mener à terme ce travail.

Nous remercions particulièrement l'équipe du laboratoire, et surtout les doctorants Mme Mellal Hanane, Mme Boukaous Leila et Mme Tir Radja Pour leur assistance ainsi que l'expérience enrichissante qu'ils nous on fait vivre durant cette période.

On tien aussi a remercier toute l'équipe de l'agence 2a en particulier Mr Amar, Mr Oualid et Mr farid pour toutes les aides qui on fournies pour nous.

En fin nous tenons à remercier vivement les habitants de la willaya de kenchla et de setif pour leur hospitalité très chaleureuse, leur aide et leur assistance lors de notre déplacement sur les lieux de collecte d'échantillons.

## *Dédicaces*

*Ce travail est dédié*

*A ma mère, décédée trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse ALLAH, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*A mon père, à qui Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*A mes sœurs.*

*A Mon cher frère.*

*A toute la famille MENADI.*

*A tous mes amis et collègues qui m'ont accompagné et soutenu durant cette année de formation en particulier Houda, Hadjer, Amar, Oualid, Farid, Hamza, Sofiane, Chaouki, Soumaya, Salah, Malik, Ahcene, Mounder.*

*Oualid*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui a été à mes cotées durant toutes les années de mes études, à ma très chère mère.*

*A mon cher père, qui a toujours été là pour moi, et qui ma encouragé pendant toute ma vie.*

*Que ALLAH les gardes et les protège.*

*A ma sœur.*

*A ma grande mère.*

*A toute ma famille.*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui me sont chères.*

*Adam*

## Résumé

Ce travail a été réalisé afin de mettre en évidence les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. , dans la région de l'Est algérien wilaya de Khenchela.

La caractérisation de 08 souches isolées porte sur une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui regroupe les tests biochimiques et physiologiques ont été réalisées, et des souches de référence de *Rhizobium* tels que *Rhizobium sullae* sp.nov.RHA6, *Rhizobium sullae* RHF ont été utilisées pour la comparaison.

Sur la base des caractères étudiés, les isolats portent les mêmes caractères phénotypique des (BNL).

**Mots clés:** *Trigonella*, caractérisation, phénotypique, BNL, nodules.

## **Abstract**

This work has been realized in order to highlighting the bacteria wich isolated from the nodules of the plant the genus *Trigonella gladiata* Stev. In East Algeria area Khenchela.

The characterization of 08 strains isolated consist of a morphological study followed by a phenotypical characterization which groups the biochemical and physiological tests, were performed, reference strains of rhizobia such as *Rhizobium sullae* sp. nov. RHA6, *Rhizobium sullae* RHF were used for comparison.

On the basis of studied characters, strains get the same phenotypic Characters of (BNL).

**Key words:** *Trigonella* ,phenotypical, characterization,Rhizobia.

## ملخص

تم انجاز هذا العمل بهدف وضع في الحسبان البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للنبات البقولي *Trigonella gladiata* Stev. في منطقة الشرق الجزائري ولاية خنشلة .

الدراسة الوصفية لـ 08 سلالات معزولة قامت على دراسة مورفولوجية متنوعة بدراسة وصفية مظهرية شملت اختبارات بيوكيميائية و فيسيولوجية تم تحقيقها, اضافة الى سلالات مرجعية لـ *Rhizobium* مثل *Rhizobium sulae* و sp.nov.RHA6 و *Rhizobium sulae* RHF تم استعمالها للمقارنة.

على أساس الصفات المدروسة , العزلات حملت نفس الصفات المظهرية للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية للبقوليات (BNL).

الكلمات المفتاحية: *Trigonella*, وصف, مظهرية, BNL, عقد جذرية

## Liste des abréviations

**BCP:** Pourpre de Bromocrésol.

**BTB :** Bleu de Bromothymol.

**BNL :** Bactéries Nodulant les Légumineuses.

**CMC:** Carboxy-Méthyl-Cellulose.

**DO:** Densité Optique.

**GPA:** Glucose Peptone Agar.

**pH:** potentiel d'Hydrogène.

**RC:** Rouge Congo.

**T Y:** Tryptone Yeast.

**TYA:** Tryptone Yeast Agar.

**YM A:** Yeast Mannitol Agar.

**YMB:** Yeast Mannitol Broth.

**NaCl :** Chlorure de sodium.

**KNO<sub>3</sub> :**Nitrate de potassium.

**NaClO :** Hypochlorite de sodium.

**Stev. :** Steven ex M.Bieb.

**L. :** de Litardière.



## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Classification courante des bactéries nodulants les légumineuses .....	8
<b>Tableau 2</b> : les souches utilisées dans cette étude .....	21
<b>Tableau 3</b> : Température de croissance testée .....	33

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : <i>Trigonella gladiata</i> Stev. (mai 2016) .....	5
<b>Figure 2</b> : Processus de la nodulation (Giles et al., 2004) .....	13
<b>Figure 3</b> : Localisation géographique de la zone de prélèvement .....	16
<b>Figure 4</b> : Conservation des nodules (Vincent, 1970) .....	17
<b>Figure 5</b> : Ensemencement par la technique des cadrans .....	19
<b>Figure 6</b> : colonie issue d'un isolement sur milieu YMA+RC .....	25
<b>Figure 7</b> : Croissance des bactéries sur milieu GPA .....	25
<b>Figure 8</b> : croissances de l'isolat sur milieu YMA .....	26
<b>Figure 9</b> : Les isolats cultivés sur YMA+BTB .....	27
<b>Figure 10</b> : Observation microscopique de l'isolat (objectif x 100) après coloration de Gram .....	27
<b>Figure 11</b> : réduction de nitrate positif(+) .....	29
<b>Figure 12</b> : test d'uréase positif (+) .....	30
<b>Figure 13</b> : test de la cellulase (+).....	31
<b>Figure 14</b> : Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation. ....	32
<b>Figure 15</b> : Tolérance au pH des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation .....	35

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
 <b>Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I- Fixation biologique d'azote .....	3
II- La symbiose.....	3
II- 1- Définition et historique .....	3
III- Les légumineuses: .....	4
III- 1-La plante hôte <i>Trigonella L.</i> .....	5
III- 1-1- <i>T.glabrata</i> Stev.....	5
a- Classification.....	6
b- Utilisation du fenugrec.....	6
c- Phytochimie de la plante .....	6
d- Recherches en cours.....	7
III- 2- Les bactéries nodulantes des légumineuses (BNL) .....	7
III- 2-1- Généralités sur les rhizobies .....	7
III- 2-2- Classification actuelle des rhizobies .....	7
IV- Etablissement de la symbiose rhizobienne .....	12
IV- 1- Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique .....	12
IV- 1-1- Préinfection .....	12
IV- 1-2- Infection .....	12
IV- 1-3- Développement du nodule et libération des bactéries .....	13
V- Génétique de la nodulation .....	14
V- 1- Gènes nod .....	14
V- 2- Gènes nif.....	14
V- 3- Gènes fix .....	14
V- 4- Gènes de la plante hôte .....	14
 <b>Chapitre II: MATERIEL ET METHODES</b>	
I- Isolement des bactéries nodulantes du Fenugrec ( <i>Trigonella glabrata</i> Stev.) .....	16
I-1- Collecte des nodules.....	16
I-2- Conservation des nodules.....	17
I-3- Isolement des souches à partir des nodules .....	17

I-3-1- Stérilisation de nodules .....	18
I-3-2- Ecrasement des nodules .....	18
I-3-3- Isolement des souches .....	18
II- Caractères culturaux .....	19
II-1- Principaux milieux de culture utilisés .....	19
II-2- Purification des isolats .....	20
II-3-Teste de la vitesse de croissance .....	20
II-4- Examens microscopiques .....	20
a- Coloration de Gram .....	20
II-5- Conservation des souches .....	20
III- Caractérisation phénotypique des isolats .....	22
III-1- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes) .....	22
III-1-1- Réduction des nitrates .....	22
III-1-1- Hydrolyse de l'urée .....	22
III-1-2- Activité cellulolytique .....	22
III-2- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques) .....	22
III-2-1-Tolérance au NaCl.....	22
III-2-2- Effet de la température .....	23
III-2-3- Effet du pH .....	23

## **Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION**

Introduction .....	24
I- Caractère culturaux .....	24
I-1- Croissance sur milieu YMA+rouge Congo .....	24
I-2- Sur Le milieu GPA+BPC .....	25
I-3- Aspect macroscopique sur milieu YMA .....	26
I-4- Croissance sur milieu YMA+ BTB (vitesse de croissance) .....	26
II- Aspect microscopique .....	27
III- Caractérisation phénotypique des bactéries .....	28
III-1- Tests biochimiques .....	28
III-1-1- Réduction des nitrates .....	28
III-1-2- Hydrolyse de l'urée .....	29
III-1-3- Activité cellulolytique .....	30

III-2- Tests physiologiques.....	31
III-2-1-Tolérance au Chlorure de sodium .....	31
III-2-2- Température de croissance .....	33
III-2-3- Effet de pH .....	34
<b>Conclusion.....</b>	<b>36</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>38</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>44</b>

# Introduction

## Introduction:

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

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

Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) comprenant notamment les espèces du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, qui ont une signification scientifique et agronomique profondes dues à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, cette relation est d'une importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour cette raison et en tenant compte de l'importance des légumineuses dans la consommation animale et humaine, une certaine attention est donnée à l'écologie des B.N.L. (habitats, effet des facteurs extrinsèques et intrinsèques, nutrition, ... (Ibekwe et col, 1995).

La légumineuse (*Trigonella gladiata* Stev.), comme d'autres légumineuses, est une bonne source de protéines alimentaires pour la consommation de l'homme et les animaux. Depuis l'Antiquité, les Grecs (et les Romains) l'ont utilisé comme fourrage médical, d'épices et de bétail. Ces graines sont utilisées comme colorant jaune, dans les cosmétiques et à des fins médicinales, et sont largement utilisées comme un engrais vert (Singh *et al.*, 2008).

La symbiose *Rhizobium*/légumineuse est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous une forme réduite, mais aussi au rhizobium pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. (Raven *et al.*, 2000).

Dans l'objectif d'étudier les bactéries associées aux nodules des racines des espèces de légumineuses du genre *Trigonella* (particulièrement *Trigonella gladiata* Stev.), nous avons effectué des travaux.

Ces derniers sont réalisés selon le plan suivant :

- isolement des bactéries à partir des nodules,
- étude morphologique et microscopique des isolats,
- une étude comparative entre les isolats et les souches témoins par une caractérisation

phénotypique qui comporte une série de tests :

- recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase),
- effet des facteurs abiotiques (pH, T°, NaCl),



# Chapitre 1

## Revue Bibliographique

## **I- Fixation biologique d'azote**

La fixation biologique de N<sub>2</sub> est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Les organismes assimilateurs de N<sub>2</sub> sont des eubactéries et archaeobactéries procaryotes réparties dans plus de 100 genres ; certaines fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose (Pelmont, 2005).

La quantité totale d'azote fixée par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996). Ces bactéries peuvent être aérobies (*Azotobacter*), anaérobies (*Clostridium*), aérobies facultatives (*Klebsiella*), des cyanobactéries (*Anabaena*) et même des méthanogènes (*Methanosarcina*). Elles peuvent habiter les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et les écorces, ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003 ; Pelmont, 2005).

La fixation d'azote par les bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996). Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte, et le partenaire bactérien le symbiote. La forme la plus connue d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, des structures multicellulaires hypertrophiques nommées nodules (Hopkins, 2003). L'association symbiotique entre une plante et la bactérie à bénéfice réciproque donne lieu à une fixation d'azote. La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intégrera les protéines végétales (Tortora *et al.*, 2003).

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

## **II- La symbiose**

### **II- 1- Définition et historique**

C'est les botanistes qui sont les premiers à avoir mis en évidence l'importance de la symbiose en biologie. C'est à eux que l'on doit les premières preuves des effets de la symbiose sur la morphologie et la physiologie des organismes. L'allemand Albert Frank

(1839-1900) utilisa le premier, en 1885, le terme de symbiose (qui signifie “vivre ensemble” en grec) (Trappe, 2005). Un an plus tard, un autre allemand, Anton de Bary (1831-1888), découvrit que la structure du lichen émergeait de l’association symbiotique. La définition de la symbiose selon Anton de Bary est : “La symbiose est l’association permanente entre deux organismes ou plus d’espèces distinctes, au moins pendant une partie de leur cycle de vie” (Ludovic, 2009).

### **III- Les légumineuses:**

Les légumineuses (Fabacées) constituent la troisième superfamille par ordre d’importance chez les angiospermes. Elles comprennent plus de 750 genres et 17000 à 20000 espèces de formes et types de croissance très diversifiées (Doyle, 1994; de Ladjudie *et al.*, 1998; Dommergues *et al.*, 1999; Doyle et Luckow 2003).

Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s’entendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles (Doyle, 1994; de Ladjudie *et al.*, 1998; Dommergues *et al.*, 1999; Doyle et Luckow 2003).

La sous-famille des Mimosoïdeae, comprend environ 3 000 espèces regroupées dans quelques 77 genres (Cannon, 2008).

La sous-famille des Caesalpinoïdeae, considérée comme la plus primitive, regroupe environ 4200 espèces dans quelques 162 genres (Simon, 2005; Cannon, 2008)

La sous-famille Papilionoïdeae, d’une évolution plus récente, comprend quelques 14.000 espèces aux fleurs irrégulières, regroupées dans environ 476 genres (Lewis *et al.*, 2003).

De nombreux taxons de la famille des légumineuses sont capables de former des associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d’azote atmosphérique de la famille des rhizobiaceae. La proportion de ces taxons varie d’une sous- famille à une autre, elle est de 90% pour les Mimosoïdeae, 20% pour les Caesalpinoïdeae et 97% pour les Papilionoïdeae (Merabet, 2007).

### III- 1-La plante hôte *Trigonella L.*

Calice à 5 dents inégales ou subégales. Pétales libres. 10 étamines diadelphes (9-1) ou complètement monadelphes (la vexillaire soudée aux autres par son milieu); filets plus ou moins épaissis au sommet. Ovaire pluriovulé, à ovules sur 2 rangs. Gousse linéaire ou oblongue, déhiscente ou non, rostrée. Plantes herbacées à feuilles trifoliolées, à folioles denticulées. Deux stipules. Annuelles. (Quizel et Santa, 1962)

#### III- 1-1- *T.gladiata* Stev.

Fleurs solitaires ou rarement géminées, sessiles à l'aisselle des feuilles. Gousses longuement apiculées, plus ou moins arquées Gousse longue de 2-4 cm, brusquement rétrécie en bec de 1-2 cm (**figure 1**). Graines fortement tuberculées. Fleurs blanchâtres, de 8-10 mm de long. Plante plus ou moins prostrée, velue-hispide, en particulier sur la gousse, haute de 5-15 cm au plus (Quizel et Santa, 1962)



**Figure 1** : *Trigonella gladiata* Stev. (mai 2016)

### **a- Classification**

**Regne:** plantae

**Phylum:** magnoliophyta

**Classe:** magnoliopsida

**Ordre:** Fabale

**Famille:** Fabaceae

**Genre:** *Trigonella*

**Especie:** *Trigonella gladiata* Stev.

### **b- Utilisation du fenugrec**

Le fenugrec est utilisé depuis de longues dates dans les pays arabes. Dans le Maghreb il est utilisé dans le traitement des plaies, diarrhées, acné, déshydratation, anémie, bronchite, rhumatismes, maux d'estomac, hypertension artérielle, constipation soit sous forme de décoctions, soit sous forme de graines réduites en farines et mélangées avec le miel. (Rahmani.M *et al* 2015).

Il est aussi reconnu pour combattre et réduire la chute de cheveux. Cette plante est également consommée comme fortifiante par les femmes après l'accouchement. Les graines ont des propriétés nutritives importantes et des effets hypocholestérolémiantes, elles sont traditionnellement utilisées comme stimulant de l'appétit et pour la prise de poids (Mekkiou R, 2005; Salhi S, Fadli M, Zidane L, *et al* 2010).

En Chine, le fenugrec sous forme d'ovules est utilisé dans le traitement des cancers du col de l'utérus. (Chevahier A, 2001)

### **c- Phytochimie de la plante**

Les graines contiennent des protides, une huile riche en acides gras insaturés et en phytostérols, des glucides, des saponosides stéroïdiques, des alcaloïdes dont la trigonelline, une huile essentielle responsable de l'odeur de la plante, du mucilage, des glucides, des vitamines (A, B1 et C), du phosphore, du chrome et du calcium (Billaud C, Adrian J, 2001 ; Skalli S, 2006 ).

#### **d- Recherches réalisées**

Des expérimentations entreprises sur des animaux ont démontré que le fenugrec retarde l'évolution du cancer du foie, stimule les contractions de l'utérus et agit sur le diabète. (Chevahier , 2001).

### **III- 2- Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL)**

#### **III- 2-1- Généralités sur les rhizobia**

La biodiversité microbienne constitue une ressource naturelle énorme pour l'humanité. Les Rhizobiums sont des bactéries du sol capables d'induire des nodules sur les racines ou les tiges de légumineuses et assurer la fixation de l'azote atmosphérique à l'intérieur de ces organes. 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).

#### **III- 2-2- Classification actuelle des rhizobiums**

La classification des rhizobiums a été passée par un changement substantiel au cours des dernières années en raison de l'ajout de plusieurs genres et espèces de ce groupe de bactéries importantes.

Des études récentes ont montrées l'existence d'une grande diversité parmi les bactéries fixatrices d'azote isolé à partir de différents légumes. Actuellement, plus de 98 espèces appartenant à 14 genres de  $\alpha$ -protéobactéries et  $\beta$ -protéobactéries ont été décrites comme rhizobiums.

Des genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella* (Classe d' $\alpha$ -protéobactéries), *Burkholderia*, *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (classe de  $\beta$ -protéobactéries) et certains  $\gamma$ -protéobactéries, forment l'ensemble des bactéries appelées les symbiotes de légumineuses.

Il y a certainement beaucoup à découvrir, puisque seulement 23% des légumineuses connues ont été identifiées spécifiquement pour la relation symbiotique à jour. La découverte de nouveaux symbiotes associés à des légumineuses est nécessaire pour avoir un aperçu en profondeur dans la taxonomie du rhizobiums.(Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

**Tableau 1 :** classification actuelle des rhizobiums (Berrada et Fikri-Benbrahim ,2014) (Weir, B.S , 2016).

Genre espèce	Source d'isolement
<b>Classe: Alphaproteobacteria</b>	
<b>Ordre: Rhizobiales</b>	
<b>Famille: Rhizobiaceae</b>	
<b>Genre: Rhizobium</b>	
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>Symbiovarviciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>Symbiovartrifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>Symbiovarofficinalis</i>	<i>Galegaorientalis</i>
<i>Symbiovarorientalis</i>	<i>Galegaofficinalis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
<i>Symbiovarmimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunianatans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovargallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Symbiovargiardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodiumsinuatum, Centrosema,</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>etc.</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Indigoferaspp.</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. multihospitium</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. oryzae</i>	Plusieurs espèces de légumineuses
<i>R. pisi</i>	<i>Oryzaalta</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Pisumsativum</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Arabidopsisthaliana</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Caraganaintermedia</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. halophytocola</i>	<i>Oxytropisglabra</i>
<i>R. radiobacter</i>	usine de dunes côtières
<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*

*R. vitis* \*

*R. nepotum* \*

Actuellement, il y'en a 49 espèces du genre rhizobia (et 11 pas du genre rhizobia).  
Rhizobium en Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)

**Genre: Ensifer**

<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>Symbiovarfredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>Symbiovarsienensis</i>	<i>Glycine</i>
	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia,</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Leucaena</i>
<i>E. teranga</i>	les plantes hôtes différentes
<i>Symbiovaracaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i> )	<i>Glycine max</i>
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>
<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>

Il ya actuellement 17 espèces de genre de bactérie dont Ensifer est en  
Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)

**Genre: Shinella**

*S. kummerowiae* *Kummerowia stipulacea*

Le genre *Shinella* contient actuellement une seule espèce rhizobia. Weir, B.S. (2016)

**Famille: Phyllobacteriaceae**

**Genre: Mesorhizobium**

<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus,</i> <i>etc.</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis,</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. thiogangeticum</i>	*
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caraganaspp.</i>
<i>M. gobiense</i>	Wild legumes
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>



*M. camelthorni* *Alhagi sparsifolia*.  
Différents arbres agroforestiers de  
*M. abyssinicae* légumineuses

*M. muleiense* *Cicer arietinum*  
Différents arbres agroforestiers de  
*M. hawassense* légumineuses  
*M. qingshengii* *Astragalus sinicus*  
*M. robiniae* *Robinia pseudoacacia*  
Différents arbres agroforestiers de  
*M. shonense* légumineuses  
*M. shangrilense* *Caragana* espèce  
*M. silamurunense* *Astragalus* espèce  
*M. tamadayense* *Anagyris latifolia*, *Lotus berthelotii*

Actuellement il ya 21e espèces du genre rhizobia dont une (1) non rhizobia. Le genre mesorhizobium en Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)

#### **Genre: Phyllobacterium**

*P. trifolii* *Trifolium pratense*

Le genre phyllobacterium contient actuellement trois espèces de rhizobia. Le/ la phyllobacterium en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

#### **Family: Methylobacteriaceae**

#### **Genre: Methylobacterium**

*M. nodulans* *Crotalaria* spp.

Le genre Methylobacterium contient une seule espèces e rhizobia,Le/la Methylobacterium en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

#### **Genre: Microvirga**

*M. lupini* *Lupinus* spp.  
*M. lotononidis* hôte légumineuse Different  
*M. zambiensis* hôte légumineuse Different

Le genre Microvirga contient actuellement trois espèces de rhizobia.Microvirga en nouvelle zélande. Weir, B.S. (2016)

#### **Famille: Brucellaceae**

#### **Genre: Ochrobactrum**

*Ochrobactrumcytisi* *Cytisus*  
*Ochrobactrum lupini* *Lupinus albus*

Le genre Ochrobacterium contient actuellement deux espèces de rhizobia. Le/la Ochrobacterium en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

#### **Famille: Hyphomicrobiaceae**

#### **Genre: Azorhizobium**

*A. caulinodans* *Sesbania rostrata*  
*A. dobereinereae* *Sesbania virgata*  
*A. oxalatophilum*

Le genre *Azorhizobium* se compose actuellement de 2 espèces Weir, B.S. (2016)

#### **Genre: Devosia**

*Devosianeptunia* *Neptunianatans*

Le genre Devosia contient actuellement une seule espèce rhizobia (et une 1 qui n'est pas une espèce rhizobia potentiellement. Weir, B.S. (2016)

**Famille: Bradyrhizobiaceae**

**Genre: Bradyrhizobium**

<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>B. betae</i>	<i>Betaevulgaris</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Genistea et Loteae</i>
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>

Il ya actuellement 9 espèces du genre rhizobia dont une (1) non rhizobia. Le genre Bradyrhizobium en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

**Classe: Beta Proeobacteria**

**Ordre: Burkholderiales**

**Famille: Burkholderiaceae**

**Genre: Burkholderia**

<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp.</i>
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. helea</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp.</i>

Le genre Burkholderia contient actuellement sept membres nommés Rhizobia et d'autres Burkholderia sp. Burkholderia en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

**Genre : Cupriavidus**

*C. taiwanensis*

*Aspalatus carnosus*

*Mimosa sp.*

Ce genre là contient actuellement une seule espèce rhizobia. Weir, B.S. (2016)

**Class: Gamma-Proteobacteria**

**Ordre: Pseudomonadales**

**Famille: Pseudomonaceae**

*Pseudomonas sp.*

*Robinia pseudoacacia*

\* Des espèces avec une capacité de formation de nodules non décrites sont incluses de façon traditionnelle comme la bactérie du genre rhizobia.

## **IV- Etablissement de la symbiose rhizobienne**

L'établissement de la symbiose entre rhizobia et la plante légumineuses est un phénomène complexe. L'interaction symbiotique entre les bactéries rhizobia et les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, Fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac (Perry *et al.*, 2004).

### **IV- 1- Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique**

Le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection. (Patriarca *et al.*, 2004) .

#### **IV- 1-1- Préinfection**

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie (Patriarca *et al.*, 2004). En condition de carence en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), la bactérie et la plante mettent en place un système de « dialogue » basé sur un échange de molécules chimiques (Perry *et al.*, 2004). Les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitooligosaccharides ou LCO) (Dénarié, 2000). L'interaction est spécifique: une souche bactérienne n'attaque pas n'importe quelle plante, et inversement la plante ne se laisse pas envahir par n'importe quelle souche bactérienne (Pelmont, 1995).

#### **IV- 1-2- Infection**

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire (Hopkins, 1999). Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de Rhizobia, la rhicadhésine est une protéine qui lie le calcium. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine

(Perry *et al.*, 2004). La bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemme (Hopkins, 2003). L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine (Duhoux *et al.*, 2004). Certains des poils absorbants infectés se courbent et forment une « crosse de berger » à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient. C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhoux *et al.*, 2004).

#### IV- 1-3- Développement du nodule et libération des bactéries

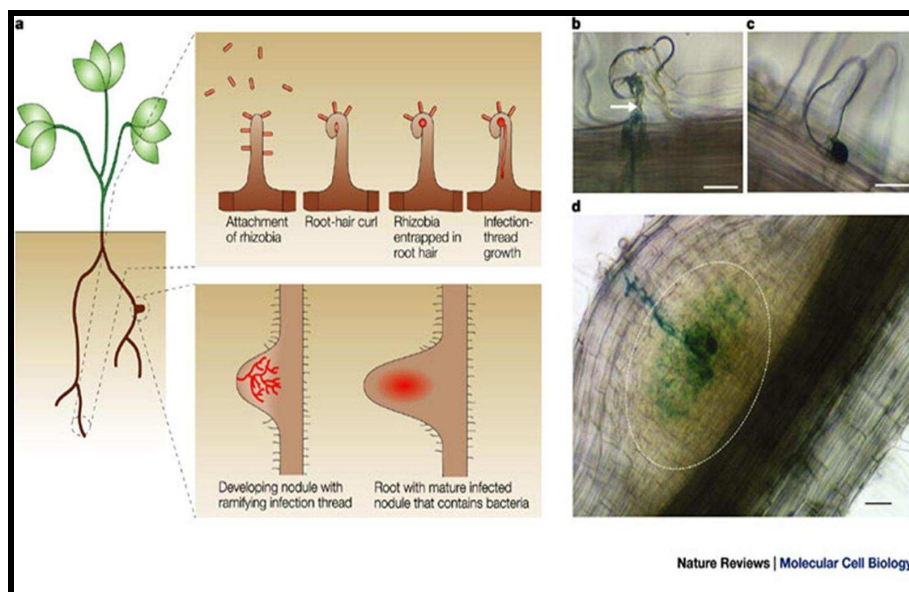
Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins *et al.*, 2003).

La division bactérienne rapide entraîne la formation d'un nodule (Perry *et al.*, 2004).

La formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi, 2001).

La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroidienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004).

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).



**Figure 2:** Processus de la nodulation (Giles *et al.*, 2004)

## **V- Génétique de la nodulation**

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de rhizobiums et dans le chromosome des souches de *Bradyrhizobium* (Raven *et al.*, 2000).

De nombreux gènes bactériens interviennent dans la nodulation de la plante (gènes *nod*) et dans le fonctionnement du nodule avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes *nif* et *fix*) (Werner, 1992). Les gènes *nod* sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes *nif* et les gènes *fix* sont regroupés dans 5 régions distinctes (Crossman, 2004).

### **V- 1- Gènes *nod***

Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005).

### **V- 2- Gènes *nif***

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le rhizobium libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy et Nougier, 2005).

### **V- 3- Gènes *fix***

Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crossman, 2004).

### **V- 4- Gènes de la plante hôte**

Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes

intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005).

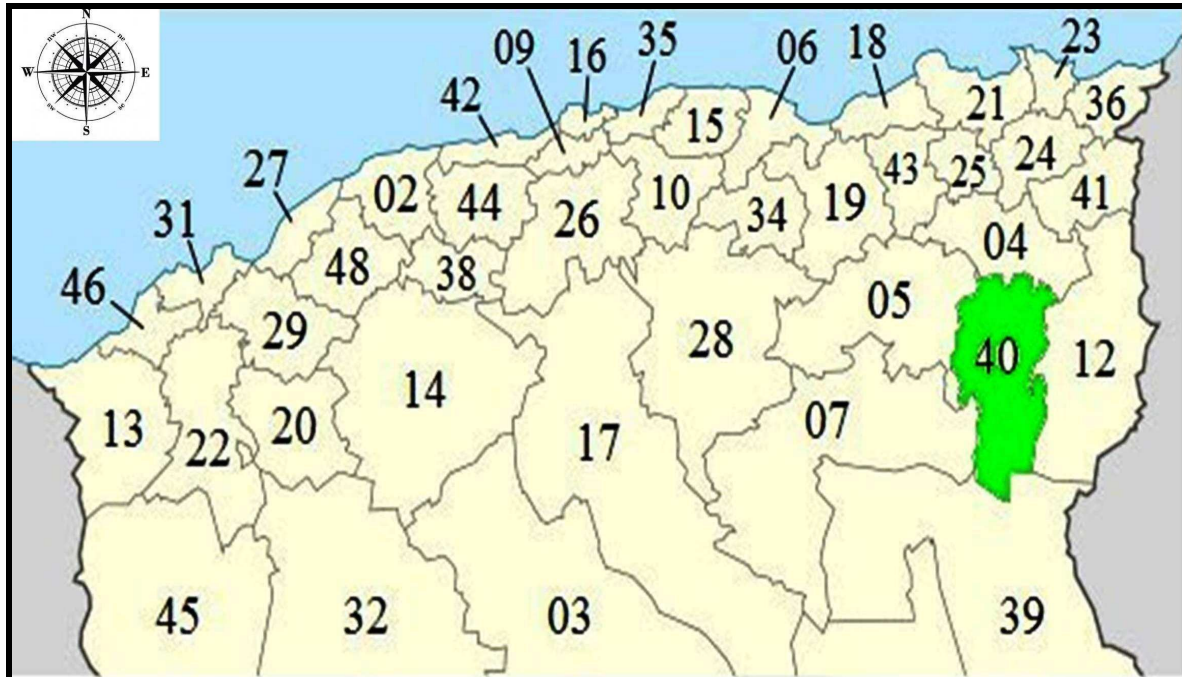
Ces nodulines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins, 2003),

# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

## I- Isolement des bactéries nodulant le Fenugrec (*Trigonella gladiata* Stev.)

Les nodules ont été obtenus à partir des racines de la plante *Trigonella gladiata* Stev. Située dans la région de Trachet commune d'el Mahmel (latitude 35.15502°N et longitude 7.28839°E) wilaya de Khenchela.



**Figure 3 :** Localisation géographique de la zone de prélèvement

### I-1- Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars et Avril quand la terre est sèche, à cette période de l'année les nodules sont bien développés et sont visibles au niveau des racines, ils sont d'une couleur rougeâtre, et peuvent indiquer la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran (Hoben 1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, se débarrasser de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules.

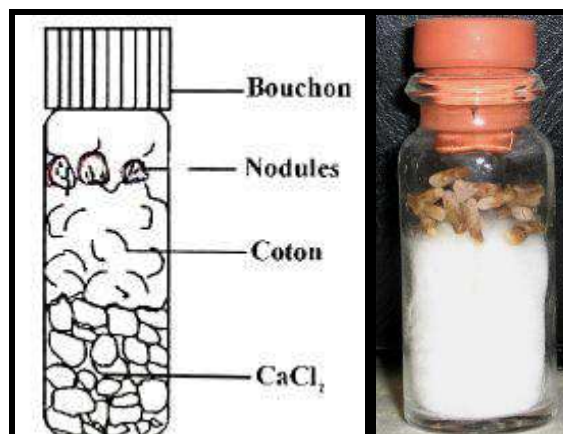
Couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.



Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau, puis à l'aide d'un couteau. les nodules sont détachés 1 à 2mm du site d'attache, en fin séchés avec du papier filtre avant leur conservation.

### I-2- Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h pour un usage immédiat. Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur qui est le chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Vincent, 1970). Qui consiste à remplir la moitié des flacons par du  $\text{CaCl}_2$  (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules. Sur chaque flaçon sont mentionnés le nom de la plante, la date et le lieu de collecte, et la date de conservation. (figure 4)



**Figure 4:** Conservation des nodules (Vincent, 1970).

### I-3- Isolement des souches à partir des nodules :

Les différentes étapes d'isolement des *Rhizobium* sont celles décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994).

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles conservés par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans de l'eau pendant 24heurs au réfrigérateur à 4°C, puis pendant 1h à température ambiante.

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

La stérilisation s'effectue sous la hotte à flux laminaire (Kottermann) selon les étapes suivantes :

Les nodules intacts sont immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis avec de l'hypochlorite de Na 3% (NaClO 3%) pendant 3 minutes.

En suite les nodules sont rincés 10 fois dans de l'eau distillée stérile et sont laissés gonfler après le 10<sup>ème</sup> rinçage.

### **I-3-2- Ecrasement des nodules**

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile.

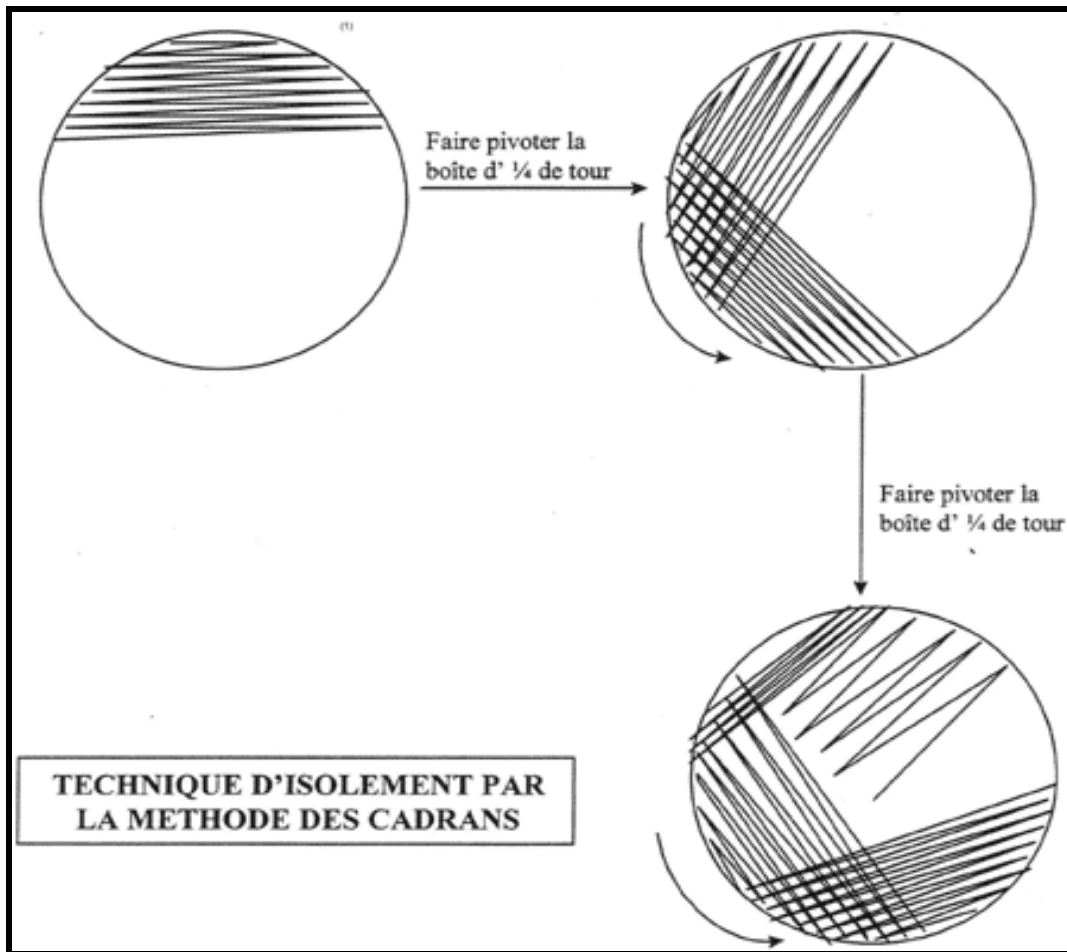
On effectue un ensemencement du nodule entier sur les milieux YMA + rouge Congo et GPA + Pourpre de bromocrésol.

Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.

### **I-3-3- Isolement des souches**

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu YMA (Vincent, 1970) additionné de rouge Congo. L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (figure 5) de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les mêmes nodules sont ensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA au BCP). Les boîtes sont incubées à 28°C. Pendant 48 à 72 heures.

Toute cette manipulation doit être effectuée sous des conditions microbiologiquement contrôlés, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen, sous une hotte à flux laminaire.



**Figure 5 :** Ensemencement par la technique des cadrans

## II- Caractères cultureux

### II-1- Principaux milieux de culture utilisés :

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. (**Annex1**).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- Milieu liquide : YMB (Yeast Manitol Broth)
- Milieux solides : YMA (Yeast Manitol Agar)
  - YMA + RC (Yeast Manitol Agar + Rouge congo)
  - YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Blue)
  - GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.

## II-2- Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994); des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis les placer dans un bain-marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique sont enfin réalisés.

## II-3-Teste de la vitesse de croissance

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

## II-4- Examens microscopiques

### a- 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 classer. Son avantage est de les classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram - (**Annexe 2**).

## II-5- Conservation des souches

Avant de conserver les souches, elles sont ensemencées dans des tubes contenant 9ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h dans un bain-marie avec agitation à une température de 30°C.

Il existe plusieurs techniques de conservation. Dans notre travail, deux méthodes sont utilisées :

La conservation se fait sur milieu YMA tamponné avec du CaCO<sub>3</sub> (3g/l) (**Annexe 1**) comme agent neutralisant de l'acidité. L'ensemencement se fait en tube incliné et les souches sont incubées à 30°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

la conservation sur YMA additionné 30% (v/v) de glycérol.

Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes d'Eppendorf en un temps de 24 à 48h d'incubation à 30°C, puis mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à -20°C

**Tableau 2** : les souches utilisées dans cette étude

Code de la souche	Nom de la souche	Plante hôte	Origine géographique	Source
T1	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
T2	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
T3	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
T4	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
N1	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
N2	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
N3	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
N4	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algerie	Notre étude
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp.nov.RHA6	<i>H.coronarium</i>	Constantine Algerie	A.Benguedouar -Constanine
F	<i>R.sullae</i> RHF	<i>H.coronarium</i>	Pise,Italie	S.Casella-Pise

### **III- Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **III-1- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)**

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

Les souches sont cultivées sur le bouillon TY contenant 0.1% de  $\text{KNO}_3$  (p/v), et incubées pendant 4 jours à 28°C ; après incubation sont ajoutés 3 à 4 gouttes des réactifs I et II.

Après addition des réactifs I et II, s'il y a une coloration rouge, les souches ont une nitrate réductase+ ; si non, on rajoute de la poudre de zinc et on note la couleur (la couleur rouge signifie la non réduction des nitrates, alors qu'un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche a la nitrate réductase).

##### **III-1-1- Hydrolyse de l'urée**

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

##### **III-1-2- Activité cellulolytique**

Les souches sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% de CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pendant 5 jours. Après incubation à 30°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 30°C. La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M ; les boîtes sont laissées 30 mn à température ambiante puis vidées. Un halo jaune orangé entoure les colonies qui montrent une présence de l'enzyme.

#### **III-2- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)**

##### **III-2-1-Tolérance au NaCl**

Pour tester la tolérance de nos isolats et les souches de références au NaCl à différentes concentrations nous avons utilisé le milieu TY avec différentes concentrations de NaCl (1%, 2%, 3%, 5%, 10%)(p/v). (85.5mM, 171mM, 342mM, 513mM, 1710mM).

Les différents milieux sont incubés à 28°C à l'étuve pendant 24h, puis on mesure la DO à 600nm.

### **III-2-2- Effet de la température**

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimale de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures : 4°C, 28°C, 37°C, 45°C.

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

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (1, 4, 6.8, 8, 10).

La DO est mesuré après 24h d'incubation à 28°C.

# Chapitre 3

## Résultats et discussion



## Introduction

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées (Vandamme *et al.*, 1996). La caractérisation phénotypique des Rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham *et al.*, 1991). Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration de Gram) et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme, et taille). Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de diverses enzymes et de composés de métabolismes. Les critères physiologiques regroupent la résistance à la température et la tolérance au pH.

Parmi les méthodes d'identification du genre *Rhizobium*, nous nous sommes basés sur celles préconisées par Vincent (1970), Beck *et al* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994).

## I- Caractère culturaux

Au départ, l'isolement et la purification des isolats nous a permis d'obtenir 11 souches qui répondent aux critères des *Rhizobium* (Gram -, forme de bâtonnets et non absorbance du rouge Congo). Parmi lesquelles on a sélectionné 8 souches pour cette étude afin d'éviter les répétitions, et on les a comparé avec 2 souches témoins *Rhizobium sullae* sp. nov. RHA6 (A6), *Rhizobium sullae* RHF (F).

### I-1- Croissance sur milieu YMA+rouge Congo

La croissance dans le milieu YMA figure parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des Rhizobia (Vincent, 1970).

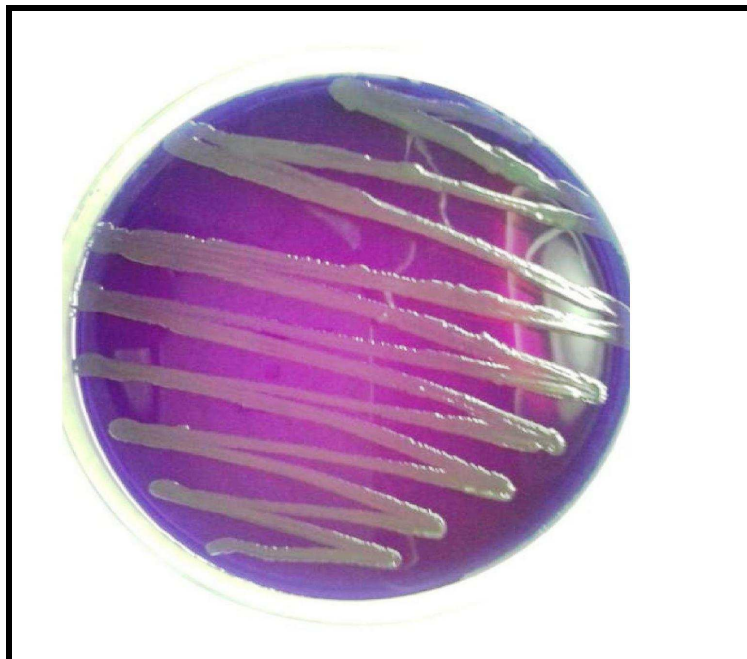
La mise en culture du broyat nodulaire sur milieu YMA + rouge Congo a donné au bout de 24 à 48h, des colonies absorbant très peu le rouge Congo (**figure 6**), seules les colonies ne l'absorbant pas sont prises en considération dans les manipulations ultérieures.



**Figure 6** : colonie issue d'un isolement sur milieu YMA+RC

### **I-2- Sur Le milieu GPA+BPC**

Ce milieu est utilisé pour le contrôle de la pureté des isolats. Tous les isolats ainsi que les souches de référence n'entraînent aucun virement de couleur du milieu après 24h d'incubation comme peuvent le faire certains contaminants notamment les bactéries a Gram positif (Beck *et al.*, 1993 ; Somasegaran et Hoben,1994).(figure 7).

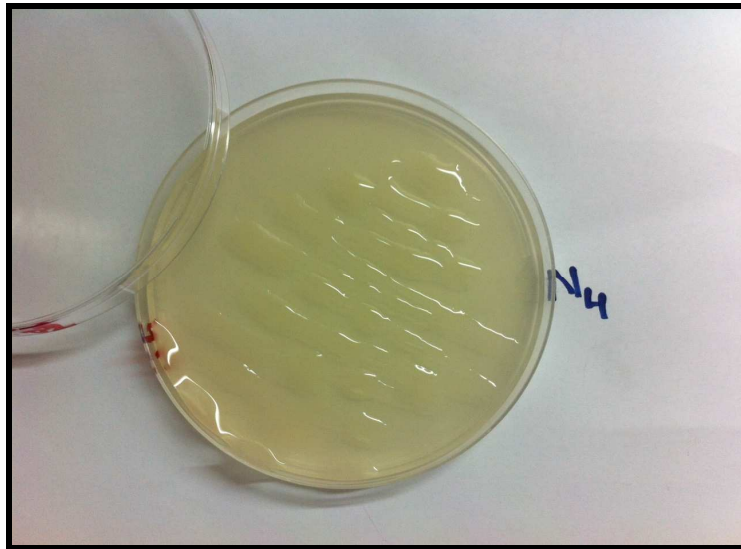


**Figure 7** : Croissance des bactéries sur milieu GPA

### I-3- Aspect macroscopique sur milieu YMA

Sur le milieu YMA, la croissance apparaît au bout de 24 à 48h sous forme de petites colonies de 2 à 5mm de diamètre, circulaires à surfaces lisses et contours réguliers, brillantes, convexes, de texture homogène et de couleur blanchâtre à crème (**Figure 8**).

Cette description est valable pour la grande majorité des colonies, et ceci correspond à la description des rhizobia par Jordan (1984).



**Figure 8** : croissances de l'isolat sur milieu YMA

### I-4- Croissance sur milieu YMA+ BTB (vitesse de croissance)

Pratiquement tous nos isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB après 72 heures d'incubation sauf la souche T2, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes (**Figure 9**). Ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide.

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes qui virent la coloration verte du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui virent la couleur verte du BTB vers le bleu ( Jordan, 1984 ; Beck, *et al.*, 1993).

Menna *et al* (2006) ont rapporté que les souches testées de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* ont pu acidifier le milieu YMA, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions alcalines.

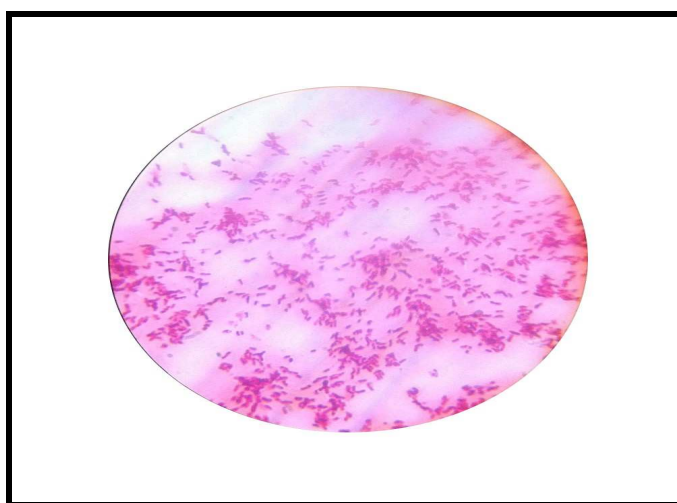
La couleur jaune reflétant la croissance rapide est pour certains auteurs (El-Hillali, 2006) obtenue au bout de 24h, pour d'autres (Pinto *et al.*, 2007) au bout de 3 à 5 jours, ce qui confirme la croissance rapide de nos isolats.



**Figure9** : Les isolats cultivés sur YMA+BTB

## II- Aspect microscopique

L'observation microscopique permet d'apprécier des bacilles courts de couleur rose, à Gram négatif. Les rhizobiums sont des bactéries du sol, strictement aérobies possédant une forme bâtonnet mobile de 0,6 à 0,9  $\mu\text{m}$  de largeur et de 1,2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur avec un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Gage, 2004)(**figure 10**). Elles sont des bacilles Gram négatif et elles ne font pas d'endospores. (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993).



**Figure 10** : Observation microscopique de l'isolat (objectif x 100) après coloration de Gram

Ces méthodes de caractérisation morphologique et culturale auxquelles on a eu recours sont également utilisées par Menna et *al* (2006) ; Pinto et *al* (2007) ; Wei et *al* (2008) pour caractériser leurs souches isolées à partir des nodules de légumineuses.

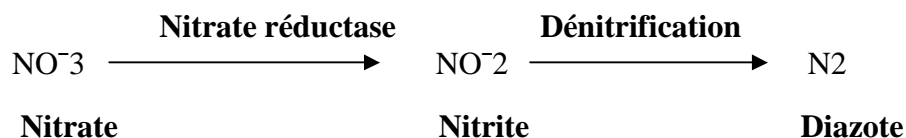
### III- Caractérisation phénotypique des bactéries

#### III-1- Tests biochimiques

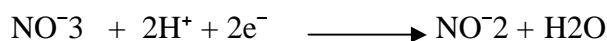
##### III-1-1- Réduction des nitrates

Toutes les souches réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs I et II de la nitrate réductase, sauf les souches N1, N2 qui a donné une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc apparaît incolore.

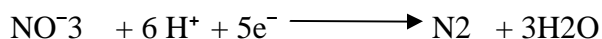
Ces résultats montrent que toutes nos souches testées réduisent les nitrates en nitrites (**figure 11**), suite à une activité de l'enzyme nitrate-réductase qui catalyse la réaction suivante:



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon :



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon :

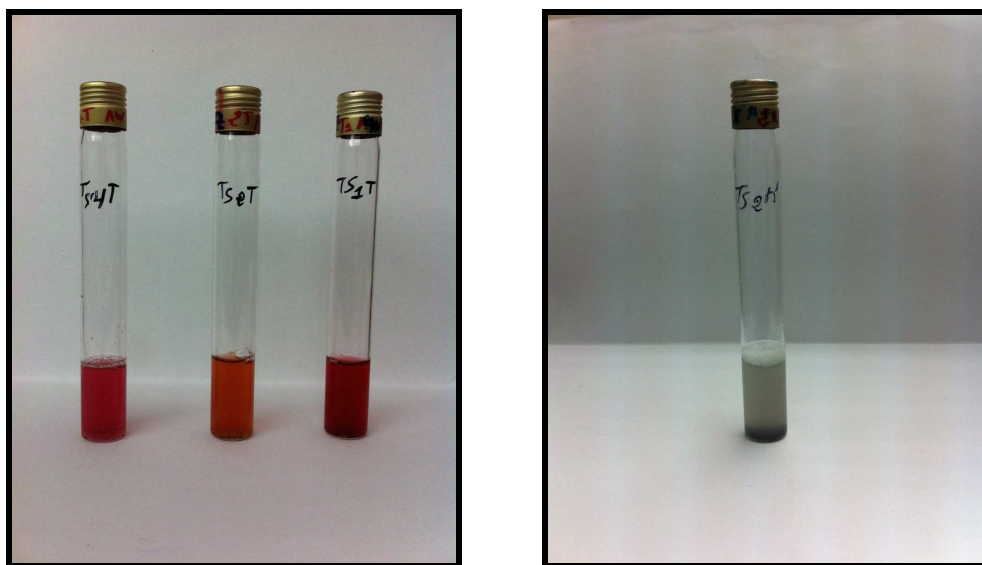


La réaction peut être rendue négative par la réduction des nitrites formés; il faut donc contrôler la réaction dans le cas de l'absence de coloration, s'il reste des nitrates en ajoutant au milieu un peu de poudre de zinc qui les réduit et entraîne une coloration (Guiraud, 1998).

Dans les milieux biologiques, la transformation des ions  $\text{NO}_3^-$  en ions  $\text{NO}_2^-$  ne peut s'effectuer que sous l'action d'une enzyme : la nitrate réductase qui est présente dans tous les organismes susceptibles de métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi que quelques espèces de levures et bactéries (chabbi, 2010).

La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents rhizobia (Mc Neil, 1982 ; Zahran, 1991). Munns (1968) ont rapporté que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des rhizobia aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective.

Des travaux récents ont montré que la sensibilité au nitrate peut varier entre les différentes souches de *Bradyrhizobium* (Gibson et Harper, 1985) alors que d'autres travaux ont montré que le nitrate affecte la compétition des souches de *Bradyrhizobium japonicum* pour infecter le soja (Martensson *et al.*, 1989).

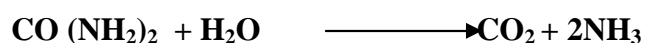


**Figure 11:** réduction de nitrate positif(+)

### III-1-2- Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des *Rhizobia* à hydrolyser l'urée grâce à l'uréase a été initialement décrite par Jarvis *et al.* (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH (El Hilali *et al.*, 2006).

Toutes les souches ont une activité uréasique positive et alcalinisent le milieu en observant un virage de la couleur de l'indicateur de pH du rouge vers le rose après 48 heures d'incubation (**figure 12**) ce qui indique l'alcalinisation du milieu par conséquent la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réaction qui suit :





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



**Figure 12:** test d'uréase positif (+)

### III-1-3- Activité cellulolytique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose.

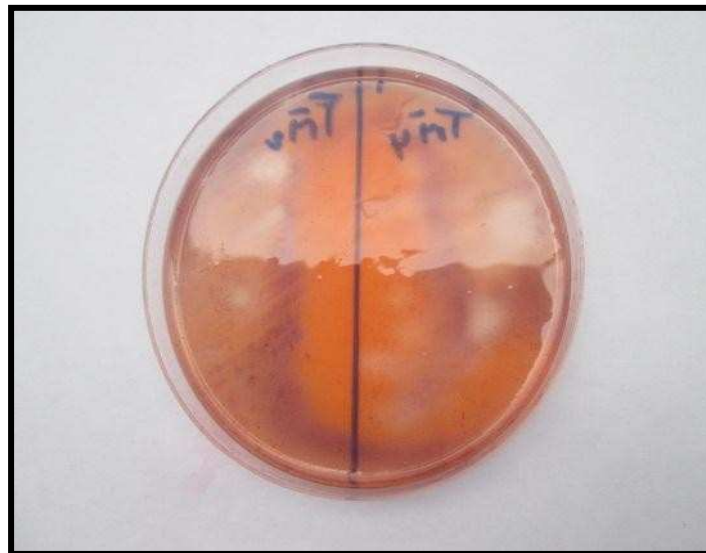
La présence d'un halo jaune orangé autour des colonies prouve la présence d'un endo  $\beta$ 1-4 glucanase, mise en évidence par hydrolyse du carbo-méthyl ester (CMC) suite à l'addition de NaCl et après rinçage.

Tous nos isolats sont capables d'hydrolyser la cellulase qui représente le constituant fibreux de la paroi végétale, c'est ainsi que les bactéries pénètrent et infectent les racines.(**figure 13**).

La polygalacturonase et l'endoglucanase sont des enzymes clés impliquées dans la phase initiale du processus d'infection. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le déroulement de cet événement. Dazzo et Hubbell (1982) et Robledo et *al* (2008) ont proposé que les enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale provoquent une dégradation localisée

qui traverse complètement la paroi du poil racinaire permettant ainsi une pénétration directe des bactéries.

La démonstration de la présence de la cellulase et du hémicellulase en plus du pectinase chez les rhizobia suppose que cette dernières infectent la plante légumineuse en hydrolysant la paroi des cellules racinaires dans le site d'infection (Martinez-Molina, 1979).



**Figure 13** : test de cellulase (+)

### III-2- Tests physiologiques

#### III-2-1-Tolérance au Chlorure de sodium

Les résultats obtenus montrent une variabilité relative de tolérance vis-à-vis de la salinité chez les souches isolées. (**Figure 14**)

La totalité de nos isolats ainsi que les souches témoins sont capables de croître jusqu'à une concentration de 3% de NaCl, avec un optimum de croissance noté chez les deux souches témoins (A6, F), à l'exception de la souche T1 qui montre une sensibilité à cette concentration.

À partir de la concentration 5% de NaCl, la croissance s'est révélée variable. En effet, les souches n1 et T4 ainsi que les deux souches témoins peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 10% de NaCl ce qui suggère que ces souches sont halotolérantes. Tandis

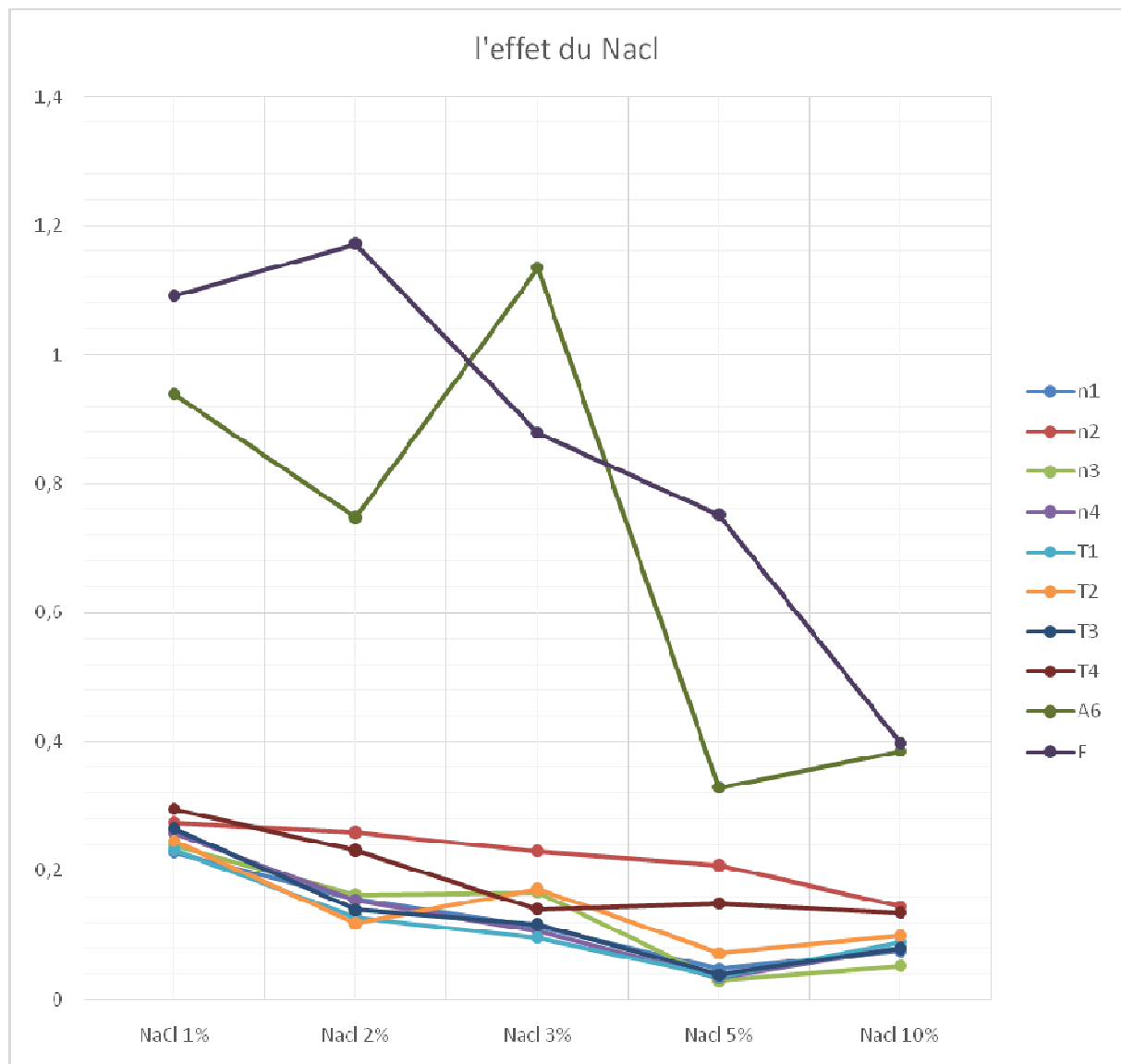


que le reste de souches isolées présentent une faible croissance à cette concentration de NaCl donc, elles ne peuvent pas supporter les fortes concentrations de NaCl.

les isolats de *Bradyrhizobium* ont pu tolérer 5% et leur croissance est inhibée à une concentration de 8% de NaCl (Raza *et al.*, 2001).

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

La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah *et al.*, 2001).



**Figure 14 :** Tolérance au NaCl des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation.

### III-2-2- Température de croissance

La plupart de nos isolats sont capables de croître à une température allant de 28°C jusqu'à 45°C ; la croissance optimale a été notée avec les températures 28°C après 24 heures et 37°C mais pour cette dernière il y a eu croissance après trois jours d'incubation pour toutes les souches ; pour la température 4°C, seulement la souche N1 a montré une bonne croissance après 3 jours d'incubation, et nous terminons avec la température 45°C où nous constatons que les souches T3, N1, N2, N3 et N4 avaient une croissance faible, pour les deux souches T2 et T4, nous avons constaté l'absence totale de croissance et seule la souche T1 a donné une bonne croissance après 3 jours d'incubation, Ce qui indique que nos isolats sont thermo-tolérants. Les mêmes résultats ont été observés chez les souches de références (**Tableau 3**).

**Tableau 3** : Température de croissance testée.

	4° C	28° C	37° C	45° C
T1	-	++(24h)	++(3jours)	++(3jours)
T2	-	++(24h)	++(3jours)	-
T3	-	++(24h)	++(3jours)	±(2 jours)
T4	-	++(24h)	++(3jours)	-
N1	+(3jours)	++(24h)	++(3jours)	±(2 jours)
N2	-	++(24h)	++(3jours)	±(2 jours)
N3	-	++(24h)	++(3jours)	±(2 jours)
N4	-	++(24h)	++(3jours)	±(2 jours)
A6	+(6jours)	++(24h)	++(24h)	+
F	+(6jours)	++(24h)	++(24h)	+

++ : Très bonne croissance  
- : pas de croissance

+ : Bonne croissance

± : Faible croissance

Graham (1992) a rapporté que les rhisobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C. Toutefois, il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques (Lipsanen et Lindström, 1989) ou bien celles isolées dans l'environnement chaud et sec de la savane du sahel en Afrique et qui peuvent tolérer des températures au-delà de 40°C (Karanja et Wood, 1988).

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

### III-2-3- Effet de pH

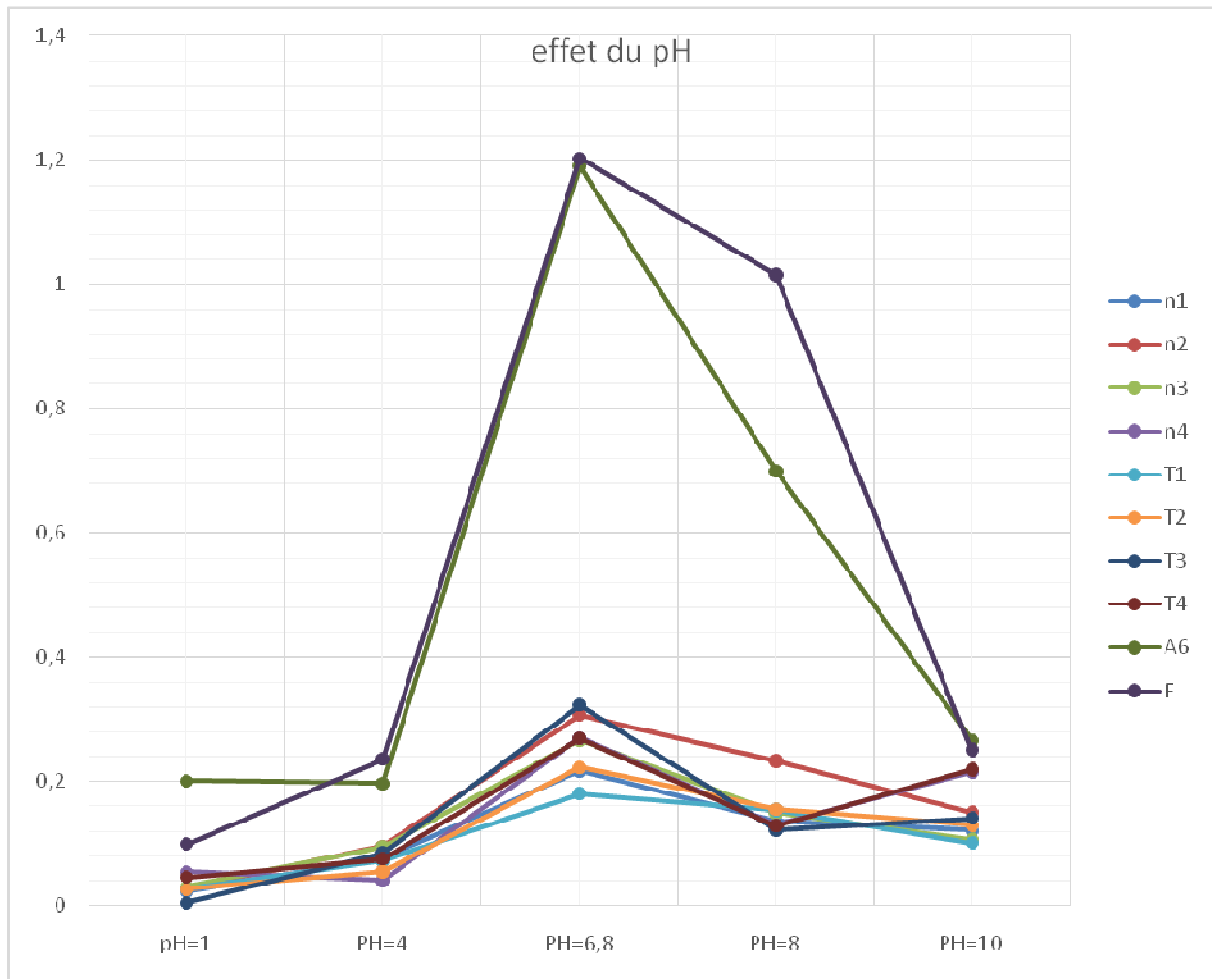
L'effet de pH montre que les souches testées varient dans leurs tolérances aux différents pH. En effet, les souches témoins sont capables de pousser dans une gamme de PH allant de 4 à 10 avec un optimum de croissance est observé à pH 6.8, alors que les souches isolées peuvent survivre dans l'intervalle allant de 6.8 à 10 avec un optimum de croissance est remarqué à pH 6.8. (**figure 15**).

Les souches témoins peuvent survivre dans les pH acides (pH 4) et elles tolèrent même un pH très bas (pH 1) donc, sont considérées comme des souches très tolérantes à l'acidité. Ce résultat concorde avec ceux enregistrés par Maatallah *et al.*(2002) qui ont détecté la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza *et al.*(2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10).

Jordan (1984) a montré que les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer des pH allant de 4.5 à 9 avec *B. brasilensis* qui croît à un pH compris entre 4 et 6 et *B. tropica* qui croît à un pH supérieur à 5 (Boddey, 2003).

Alors que nos isolats sont incapables de supporter les pH acides, ce qui prouve que ces souches sont sensibles aux pH acides.

La tolérance des rhizobia à un pH acide dépend de leur capacité de maintenir un pH intracellulaire entre 7.2 et 7.5, même à un pH acide externe.



**Figure 15 :** Tolérance au pH des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation.

Conclusion

## Conclusion:

L'association symbiotique fixatrice d'azote est très diversifiée et responsable de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire de globe ; les plus connues et les mieux étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plante de la famille des légumineuses, et en limitant les engrais azoté qui sont couteux et polluants. Coloniser les milieux dégradés par les légumineuses, Enrichir le sol en matière organique Faciliter l'implantation d'autres plantes

Ce travail avait a pour objectif, d'une part, d'étudier les caractères phénotypiques des Rhizobium isolés de la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Et d'autre part, d'apprécier la diversité existante au sein des souches.

Dans notre étude nous avons mis en évidence le contenu nodulaire de la légumineuse de l'espèce sauvage *Trigonella gladiata* Stev.. Collectée à partir de l'Est Algérien, wilaya de Khenchela.

Nous avons isolé 10 souches et sélectionné 8 parmi elles pour notre étude, L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, à l'aspect des colonies et à l'examen microscopique montre que l'ensemble des isolats ont les même caractères des Rhizobia.

Toutes les souches ont une faible absorption de rouge de Congo, n'acidifies pas le milieu GPA et ont une croissance rapide sur le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol,.

Dans L'évaluation de la tolérance de nos souches vis-à-vis des facteurs abiotiques, nous avons constaté que celles-ci présente une tolérance au stress salin allant jusqu'à une concentration de 5% de NaCl. Nos souches sont également capables de pousser sur des pH très variables allant de 4 jusqu'à 10, avec un optimum de croissance à pH 6.8.

Quant à la température, les souches peuvent craoitres dans les milieux froids (4°C) que dans les milieux chauds 50°C, avec une température optimale de croissance entre 28°C et 37 °C.

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base génétique pour les travaux

Ultérieurs. Qui on peut noter :

- l'exploitation de la grande tolérance des souches aux différents stress environnementaux et de leur potentiel fixateur d'azote par leur utilisation dans des essais d'inoculation sous serre Puis au champ.

- l'établissement de stratégies d'amélioration efficace de la symbiose par la production d'inoculum de bonne qualité, c'est-à-dire l'étude de l'aptitude des souches sélectionnées à survivre et à maintenir leur potentiel symbiotique durant le stockage de l'inoculum, pendant l'inoculation au champ et durant les années suivantes (besoin de réinoculation).

-Une étude plus approfondie basé sur les méthodes moléculaires et nécessaire pour l'identification de nos isolats et pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi un tout autre genre des protéobactéries.

# Références



**Appunu C., Dhar B., 2006.** Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. African Journal of Biotechnology, Vol. 5(10), pp. 842-845.

**Beck D P., Materon L A., Afandi F., 1993:** Practical *Rhizobium* –legume technology manual, .ICARDA (Ed), Syria, pp389.

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

**Billaud C., Adrian J., 2001.** Le fenugrec : composition, valeur nutritionnelle et physiologique. Sci Alim 21:pp3–26

**Boddey L H., 2003.** Ocorrência e diversidade de bacterias diazotrófica do gênero Burkholderia, ispladas de cana-de-çúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil. DSc Tyhesis, Univ. Federal Rural do Rio Janeiro, R J. Brasil.

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

**Cannon. S., 2008.** Chapitre 3 : Legume comparative genetics

**Chevahier A., 2001.** Larousse des plante medicinales. Identification, Préparation, Soins. (2<sup>e</sup>ed ; Traduit par Pierre Vican). Landres : Kindersieg limited ; pp277.

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

**Dazzo F.B et Hubbell D., 1982.** Control of root hair infection. In Broughton, W. (ed). Nitrogen Fixation. *Rhizobium*, Vol 2. UK : Clarendon Press, Oxford, pp 274-310. ISBN 0-19854552-5.

**De Ladjudie P., Dupuy N., Ndiaye A., Neyra M., Boivin C., Gillis M et Dreyfus B., 1998.** Acacia : nodulation et rhizobium associés. **site**.pp359-375

**Dénarié J., 2000.** Texte de la 8<sup>ème</sup> conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.

**Diouf A., de Lajudie P., Neyra M., Kersters K., Gillis M., Martínez-Romero E., Gueye M., 2000.-** Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West

Africa (Senegal and Gambia). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50 :pp 159–170.

**Dommergues Y., Duhoux E., et Diem H. G., 1999.** Les arbres fixateurs d'azote, (Ed) CIRAD, ESPACE, FAO, IRD; Montpellier, Rome, Paris, pp499

**Doyle J.J., 1994.** Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**: pp325–349.

**Duhoux E., Nicole M., 2004.** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France, pp 1- 20.

**Dupuy Y. et Nougier P., 2005.** Les microorganismes. Du gene à la biosphere. Edition Ellipses. Paris.

**Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131:pp 900–10.

**El-Hilali., 2006.** La symbiose Rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat : Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V - AGDAL. Rabat. 189pp.

**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:pp 382-388.

**Gibson A. H., and J. E Harper., 1985.** Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* **25**,pp 497-501.

**Giles E.D., Oldroyd., Dawnin J.A., 2004.** Calcium, Kinases and nodulation signalling in legume. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, pp 566-576.

**Graham P. H., 1992.** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**,pp 475-484.

**Graham P H., Draeger K., Ferrey M L., Conroy M J., Hammer B E., Martinez E., Naarons S. R., and Quinto C.,1994.** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* 40:pp 198-207.

**Graham P.H., Sadowsky M. J., Kersters H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W., Young J.P., 1991.** Proposed

minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, pp 582-587.

**Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

**Hopkins W.G., 1999.** Introduction to plant physiology, second edition. John Wiley and sons, Inc.

**Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck , pp 99-119.

**Ibekwe A.M., Angle J.S., Chaney R.L., van Berkum P., 1995.** Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. *J. Environ. Qual.* 24, 1199–1204. *J Bacteriol.* 187:pp 405-414.

**Jarvis B. D. W., T. S. Mc lean, I. G. C. Robertson, and G. R. Fanning., 1977.** Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20, pp42-52.

**Jordan D.C., 1984.** Rhizobiaceae. In: Kreig, N R (ed) *Bergey's manuel of systematic Bacteriology* 1:pp 234-256.

*Jordan D C, 1984: Family III. Rhizobiaceae. pp 234-257 .in Bergey's manual of systematic bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Vol 1. NR Krieg and JG Hold, eds. The Williams& Wilkins Co., Baltimore. Jung G, Mugnier J, Diem HG, Dommergues YR (1982).*

**Karanja N. K., and M. Wood., 1988.** Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya. Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant Soil.* 112,pp 15-22.

**Lewis G.P., Schrire B.D., Mackinder B.A., Lock J.M., 2003.** Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK

**Lipsanen P., and K. Lindström., 1989.** Lipopolysaccharides and protein patterns of *Rhizobium* sp. (*Galega*). *FEMS Microbiol. Lett.* 58,pp 323-328.

**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.

**Ludovic C., 2009.** Analyse systémique de la symbiose intracellulaire : évolution et organisation du réseau métabolique des endocytobiotés. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat. Université Claude Bernard - Lyon 1.

**Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002.** - Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22 :pp 321–329

**Machrafi Y., 2001.** Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Thèse pour l'obtention du Diplôme de maître des sciences. Université Lava.

**Martensson A. M., L. Brutti., and H. Ljunggren., 1989.** Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. *Plant Soil*. **117**:pp 219–225.

**Martinez-Molina E., Morales V. M., Hubbell D. H., 1979.** –Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. . *Appl. Environ. Microbiol.*38(6) :pp 1186-1188.

**McNeil D. L., 1982.** Variation in *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, pp647-652.

**Merabet C., 2007.** Diversité et rôle des rhizobia des régions salées et arides d'Algérie. Thèse de Doctorat, Université d'Oran

**Mekkiou R., 2005.** Thèse de doctorat. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox* pp199

**Menna P., Hungria M., Barcellos F.G., Bangel E.V., Hess P.N., Martinez-Romero E., 2006.** Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: pp315-332.

**Mobley L.T.H., 1992.** – Urease Microbial .J Lederberg (ed). *Encyclopedia of microbiology* .4 :pp327-346.

**Munns D. N., 1968.** Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil*. **29**,pp 33–49.

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

**Pelmont J., 1995.** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. Vol 2. pp 541-572.

**Pelmont J., 2005.** Biodégradation et métabolisme. EDP Science.

**Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004.** Microbiologie. Edition Dunod, Paris. pp 633-635.

**Pinto F.G.S., Hungria M et Mercante F.M., 2007.** Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Biochem. 39 (8):pp 1851-1864.

**Quezel P., Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, pp 514.

**Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S.E., 2000.** Biologie végétale. 6ème Edition de Boeck, Paris.

**Rasanen L.A., 2002.** - Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

**Raza S., Jørnsgard B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L., 2001.** - Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. Letters in Applied Microbiology 32 (6):pp379-383.

**Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Velázquez E., Trujillo M.E., Zurdo-Pineiro J.L., Ramirez-Bahena M.H., Ramos B., Diaz-Minguez J.M., Dazzo F., Martinez-Molina E., et Mateos P.F., 2008.** *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:pp 7064-7069.

**Rahmani.M , F. Toumi-Benali , L. Hamel · M. M. Dif.(2015).** Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Trigonella foenumgraecum* L.

**Saadallah K., Drevon J.J., et Abdely C., 2001.** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21 :pp 627-634. INRA, EDP Sciences.

**Salhi S., Fadli M., Zidane L., et al., 2010.** Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc) Lazaroa 31: pp133-46

**Simon J.P., 2005.** Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. Préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal

**Singh B., Kaur R., Singh K., 2008.** Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). African Journal of Biotechnology Vol. 7 (20), pp 3671-3676.

**Skalli S., 2006.** Malformations associées à la prise de fenugrec au cours de la grossesse. Bulletin préparé par le Centre Marocain de Pharmacovigilance Vol 3, No 11

**Somasegaran P., Hoben H J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.

**Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.

**Tortara G.J., Funk B.R. et Case C.L., 2003.** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de pages 945.

**Trappe J.M., 2005.** A.b. frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. Mycorrhiza, 15(4), pp 277–281.

**Vandamme P.B., Grillis P.D.V., Kersters K., Swing J., 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60, pp 407-438.

**Vincent J.M., 1970.** The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

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

**Weir B.S., 2016.** The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: X Jan, 2016

**Werner D., 1992.** Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.

**Zahrán H. H., 1991.** Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils.* 12, pp 73-80.

**Zahrán H.H., 1999.** *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* sp. 63(4) : pp968-989.

Annexe

## Annexe 1

### Milieux de culture et solutions utilisées

#### Composition de milieu YMB (Yeast Manitol Broth) en g/l (Vincent., 1970)

Manitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
NaCl	0.10
MgSO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0.20
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min

#### Composition de milieu YMA (Yeast Manitol Agar) en g/l (Vincent., 1970)

YMB	1000 ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min

#### Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de Rouge Congo	10 ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min

Après l'ajustement de pH on ajoute 10 ml de Rouge Congo (0.25 g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillé) puis on ajoute l'agar.



### **Composition de milieu YMA+ BTB (bleu de Bromothymol) en g/l**

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de Bromothymol	5ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

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

### **Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar+ pourpre de bromocrésol) en g/l**

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de BCP	10 ml
Agar	18g
pH	6,8

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

### **Composition de milieu TY (Tryptone Yeast) en g/l**

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,87
pH	6,8

La stérilisation du milieu se fait par autoclavage 120°C pendant 20 minutes

## Annexe 2

### Coloration de Gram

La préparation est étalée en couche mince sous la hotte, le protocole expérimental consiste à:

- Recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute,
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone,
- Laver à l'eau distillée
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir pendant 1 minute,
- Laver à l'eau distillée,
- Sécher avec un papier absorbant,
- Observer au microscope (x 100).

### Annexe 3

#### Tableaux des différents résultats

**Tableau a :** résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats et des souches de références au NaCl après 24h d'incubation.

	T1	T2	T3	T4	N1	N2	N3	N4	A6	F
1%	0.231	0.245	0.265	0.295	0,228	0,274	0,238	0,258	0,939	1,091
2%	0.128	0.118	0.139	0.231	0,156	0,259	0,162	0,154	0,748	1,171
3%	0.096	0.171	0.117	0.140	0,114	0,230	0,166	0,107	1,135	0,879
5%	0.036	0.072	0.039	0.149	0,048	0,208	0,030	0,034	0,329	0,752
10%	0.890	0.099	0.080	0.135	0,076	0,144	0,052	0,079	0,385	0,399

**Tableau b :** résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des des isolats et des souches de références au pH après 24h d'incubation.

	T1	T2	T3	T4	N1	N2	N3	N4	A6	F
PH=1	0,026	0,027	0,004	0,045	0,022	0,026	0,031	0,054	0,201	0,099
pH=4	0,072	0,055	0,084	0,075	0,076	0,095	0,095	0,040	0,197	0,235
pH=6,8	0,179	0,222	0,322	0,269	0,216	0,307	0,266	0,270	1,190	1,203
pH=8	0,153	0,155	0,121	0,128	0,134	0,233	0,149	0,129	0,700	1,016
pH=10	0,100	0,130	0,140	0,219	0,120	0,150	0,107	0,215	0,266	0,250

**ANALYSE DU MICROSÝMBIOTE ISOLE A PARTIR DES RACINES DE LA  
LEGUMINEUSE *TRIGONELLA GLADIATA* STEV.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie microbienne

Ce travail a été réalisé afin de mettre en évidence les bactéries qui ont été isolée à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse *Trigonella gladiata* Stev., dans la région de l'Est algérien wilaya de Khenchela.

La caractérisation de 08 souches isolées porte sur une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui regroupe les tests biochimiques et physiologiques ont été réalisées et des souches de référence de *Rhizobium* tels que *Rhizobium sullae* sp.nov.RHA6, *Rhizobium sullae* RHF ont été utilisées pour la comparaison.

Sur la base des caractères étudiés, les isolats portes les mêmes caractères phénotypique des (BNL).

**Mots clés :** *Trigonella*, caractérisation, phénotypique, BNL , nodules.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC), Faculté des Sciences de la Nature, Université des frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** *Riah Nassira* (maitre de conférences « B »- UFM Constantine),  
**Rapporteur :** *Chabbi Rabah* (maitre-assistant« A » - UFM Constantine),  
**Examineur :** *Benkahoul Malika* (maitre de conférences « B » - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 13/06/2016