



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 : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

**Contribution à l'étude des certaines activités enzymatiques
et l'effet du PH chez les bactéries nodulant les
légumineuses du genre *Phaseolus***

Présenté et soutenu par : *Bouzraïb Houda*
Bouziane Hadjer

Le : 19/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Madame D.SATTA (professeur à l'université des Frères
MentouriConstantine)*

Rapporteur : *Madame M. SAOUDI (maitre assistante classe A à l'université des Frères
Mentouri Constantine)*

Examineurs : *Madame S.BECKRI maitre assistante classe A à l'université des
Frères Mentouri Constantine)*

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

*Nous tenons à remercier très chaleureusement notre plus profonde gratitude, notre plus grand respect à madame **M.SAOUDI**, nous vous remercions d'avoir été toujours présente et nous avoir suivis régulièrement pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ces conseils précieux et ces encouragements.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à madame **D.SATTA** professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine de nous avoir fait l'honneur de présider le juré de ce travail*

*Nous remercions aussi à madame **S.BECKRI** maître assistante classe A à l'université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.*

Nous présentons notre plus grand respect au B. Laila, M. Hanane et T. Radja. Qui nous a assistés et guidés malgré toutes ses obligations nous vous remercions par leur aide leur conseils bénéfiques et leur sympathie.

Nous remercions toute la promo de Génétique, et toute l'équipe de laboratoire de recherche de biotechnologie.

Nous présentons par avance nos excuses aux personnes que nous avons oublié de remercier.

Dédicaces

Merci ALLAH de m'avoir donnée la capacité d'écrire et de réfléchir, la force de croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " Ya RAB'

Je dédie ce travail en premier lieu à mes parents Kamel et Akila, qui ont toujours été présents à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Je ne saurai jamais vous remercier pour la patience dont vous faites preuve ni pour le réconfort que je trouve auprès de vous. Je n'aurais sûrement pas réalisé tout ce chemin sans votre aide constante

Que DIEU les garde et les protège.

Je le dédie à mesœur Razane Nessrine et mes adorables frères: Seif Eddine, Mohamed Cherif, et Naji Mohie Eddine

Une énorme dédicace à mes oncles et tantes surtout Amira et leurs filles et fils.

A mes grands-mères et mon grand père

A toute la famille "Bouzraïb" et "Boukalaa"

A toutes mes amies surtout Bouziane Hadjer ; Akacha Moufida et Boumdiane Hadjer qui m'ont aidé, soutenu et encouragé,

A tous ceux que j'aime et m'aiment.

A toute la promotion de Génétique spécialement

B. Rayanne B. Mounira, B. Amira et Z. Meriem et l'équipe de laboratoire de microbiologie surtout Hanane, Meriem, Oussama, Oualid, Adem, Houssein, et Issam

Je dédie ce travail.

Houda

Dédicaces

A mon cher père

Malgré il est mort mais il est toujours présente dans mon cœur

A ma chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mes chers frères

Khalef, Rachide, Abd el ghani, Moustafa. J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez. Que Dieu vous préserve.

A mes soeurs Djalila, Wafa, Amel et surtout Karima qui ont toujours été présentes prêtes à me soutenir et me reconforter en toutes circonstances vous représentez pour moi tout mon univers.

A mes neveux et nièces

Nouna, Abdo, Karim, Hamouda, loudjeine, Mariya, Nihel, Mouna, Tima, Samer, Amar, Yacer ; et mes petits anges, Djihan, Nour et youssef. Que Dieu tout puissant vous donne longue vie, beaucoup de santé et vous préserve du mal.

*A mes belles-soeurs Noura, soheila, Hadjer et surtout Sihem
Vers lesquelles j'ai un grand respect.*

A toute la famille Bouziane et Boucharab

Tout particulièrement, à Hamza

Je te remercie énormément pour ton soutien moral, et tes précieux conseils.

*A mon bras droit, ma moitié et mon binôme Houda qui m'a apporté :
force, amitié, patience*

*A tous mes camarades de promotion, surtout Mounira et Amira
Et a toute l'équipe du laboratoire des Biotechnologies surtout
Oualid et Adam, Meriem et Hanane, Oussama Issam et Housseem.
Toute ma gratitude et ma sympathie pour vous soutien.*

B. Hadjer

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. La plante du genre <i>Phaseolus</i> près de champs de benzouit (Skikda, 2015)..... | 4 |
| Figure 2. Processus microbiens impliqués dans le cycle de l'azote (UVED, 2005)..... | 6 |
| Figure 3. Morphologie de <i>Rhizobium trifolii</i> (Dazzo, 1995)..... | 8 |
| Figure 4. Échanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose <i>Rhizobium</i> /légumineuse Nod-dépendant (Lindstrom <i>et al.</i> 2010)..... | 12 |
| Figure 5. Différentes étapes de la nodulation (Parsons et Day, 1990)..... | 13 |
| Figure 6. Différents types de gènes <i>nod</i> (Anonyme, 2010)..... | 14 |
| Figure 7. Nitrogénase et mécanismes d'action (Yann, 2006)..... | 16 |
| Figure 8. Technique d'ensemencement sur le milieu YMA; YMA.RC..... | 20 |
| Figure 9. Schématisation de l'action des lipoprotéinases (Jean-noël Joffin Guy Leyral, 2006)..... | 23 |
| Figure 10. Technique d'ensemencement du milieu Mannitol-Mobilité..... | 24 |
| Figure 11. Observation microscopique des bactéries de forme coccobacille à Gram négatif (Objectif X100)..... | 28 |
| Figure 12. Aspect des colonies bactériennes sur YMA (S2)..... | 29 |
| Figure 13. Aspect des colonies sur YMA.RC (S1)..... | 29 |
| Figure 14. Acidification du milieu YMA+BTB (B1)..... | 30 |
| Figure 15. Test de nitrate réductase positif..... | 31 |
| Figure 16. A : Test Uréase négatif (A6), B : Test Uréase positif (T2)..... | 32 |
| Figure 17. A : Test cellulase positif (Z2), B : Test cellulose négatif (B2)..... | 32 |
| Figure 18. Résultat de pectinase (Z1)..... | 33 |
| Figure 19. Résultat de lécithinase positif (T2)..... | 33 |
| Figure 20. Résultat Mannitol- Mobilité positif..... | 34 |
| Figure 21. Résultat TSI positif..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figure 22. Résultat Citrate de Simmons négatif..... | 35 |
| Figure 23. Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 24h..... | 36 |
| Figure 24. Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 48h..... | 36 |
| Figure 25. Profil d'électrophorèse d'ADN génomique..... | 37 |

Liste des Tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1. classification des rhizobiums(Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014) | 8 |
| Tableau 2: isolats et des souches de référence utilisée pour cette étude | 18 |
| Tableau 3: Aspect des colonies sur la gélose au jaune d'œuf et enzymes détectées | 24 |

Liste des Abréviations

BNL: Les Bactéries Nodulant les Légumineuses

BTB: Bleu de Bromothymol

CMC:Carboxy-Methyl-Cellulose

DO: Densité Optique

EPS:*exo*exopolysaccharides

hsn :*host specific nodulation*

LCOs:lipo-chitooligosaccharides

lps :lipopolysaccharides

CH₄ :méthane

DO: Densité Optique

EPS:*exo*exopolysaccharides

hsn :*host specific nodulation*

LCOs:lipo-chitooligosaccharides

lps :lipopolysaccharides

N₂: Azote

NO₃⁻ : nitrate

NH₄⁺:d'ions ammonium

NH₃: ammoniac

RC: Rouge Congo

TYB, TY:Trypton-Yeast-Agar

TSI: Triple-Sugar-Agar

YMA: Yeast-Mannitol-Agar

YMB: Yeast Manitol Broth

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Intoduction.....1

Chapitre I : Revue bibliographique

I – Les légumineuses.....3

I.1-Généralité.....3

I.2- Le *Phaseolus*.....4

I.2.1-Description morphologique et botanique.....4

I.2.2- Taxonomie.....4

II-Le cycle d'azote.....5

II.1-La fixation industrielle6

II.2-La fixation biologique6

III–*Rhizobium*.....7

III.1-Principales caractéristiques.....7

III.2-Taxonomie des *rhizobiums*.....8

IV- L'interaction *rhizobium*-légumineuse.....11

IV.1-Infection.....12

IV.2-Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....12

IV.3-Généétique de la fixation et de nodulation13

IV.3.1-Gène nod D.....14

IV.3.2- Gène *nif*.....16

IV.3.3- Gènes *fix*.....17

Chapitre II : Matériel et méthodes

| | |
|---|-----------|
| I-Isolement et purification des isolats..... | 18 |
| I.1- l'isolement des isolats..... | 18 |
| I.2-Purification et conservation des isolats..... | 19 |
| II-Caractères Phénotypiques..... | 19 |
| II.1-Aspect microscopique(Coloration de Gram)..... | 19 |
| II.2-Aspect macroscopique | 19 |
| II.2.1- Croissance sur milieu YMA, YMA.RC..... | 19 |
| II.2.2-Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB..... | 20 |
| III- Tests biochimiques..... | 20 |
| III.1-Recherche des enzymes spécifiques..... | 20 |
| III.1.1-Rcherche de la nitrate-réductase..... | 21 |
| III.1.2-Hydrolyse de l'urée..... | 21 |
| III.1.3-Activité cellulosique..... | 22 |
| III.1.4- Activité pectinolytique..... | 22 |
| III.1.5- L'activité « lécithinasiq » (phosphatidyl-choline-estérases) | 22 |
| III.2-Fermentation des sucres..... | 24 |
| III.2.1-Sur milieu mannitol- mobilité..... | 24 |
| III.2.2- Sur milieu TSI (Triple-Sugar-Agar)..... | 25 |
| III.2.3- Sur milieu Citrate de Simmons..... | 25 |
| IV-Effet du PH sur la croissance des isolats..... | 26 |
| V- Extraction d'ADN Génomique Bactérien..... | 26 |

Chapitre III : Résultats et discussion

| | |
|---|-----------|
| I-Isolement et purification des isolats..... | 28 |
| II -Caractères phénotypique..... | 28 |
| II.1-Aspect microscopique (Coloration de Gram) | 28 |
| II.2-Aspect macroscopique | 28 |
| II.2.1- Croissance sur milieu YMA, YMA +RC..... | 28 |
| II.2.2-Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB..... | 29 |
| III- Tests biochimiques..... | 30 |
| III.1-Recherche des enzymes spécifiques..... | 30 |
| III.1.1-Recherche du nitrate-réductase..... | 30 |
| III.1.2-Hydrolyse de l'urée..... | 31 |
| III.1.3-Activité cellulosique..... | 32 |
| III.1.4-Activité pectinolytique..... | 32 |
| III.1.5- Test d'hydrolyse de la lécithine..... | 33 |
| III.2- Fermentation des sucres..... | 34 |
| III.2.1-Mannitol-Mobilité | 34 |
| III.2.2-Sur milieu TSI (Triple-Sugar-Agar)..... | 34 |
| III.2.3-Sur milieu Citrate de Simmons..... | 35 |
| IV-Effet du pH sur la croissance des isolats..... | 35 |
| V- Extraction d'ADN Génomique Bactérien..... | 37 |
| Conclusion..... | 38 |
| Référence..... | 39 |
| Annexes | |

Résumé

Le Haricot(*Phaseolus*) est une légumineuse riche en amidon et en protéines, joue un rôle important dans l'alimentation humaine, en particulier dans certaines régions tropicales d'Afrique et d'Amérique latine. Le genre de *Phaseolus* a été cultivée en Algérie depuis des centaines d'années, notamment dans les régions subhumides et semi arides .

Des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse du genre *Phaseolus* sont caractérisés par une étude phénotypique basée sur des caractères morphologiques et cultureux ainsi la recherche d'enzymes spécifiques (hydrolyse de l'urée, activité cellulosique, réduction des nitrates, activité pectinolytique et d'hydrolyse de la lécithine) qui donne une description comparable à celle des *Rhizobium*, d'autres part, l'étude des enzymes assurant la fermentation de certains sucres ; Mannitol, Citrate de Simmons ... a été réalisé.

L'étude de facteur abiotique, le pH fait ressortir que la croissance des isolats est observée aussi bien à pH voisin de l'acidité qu'aux pH alcalins.

Mots clés : *Phaseolus*, isolats, *Rhizobium*.

Abstract

The Bean (*Phaseolus*) is a leguminous plant rich in starch and out of proteins, plays a big role in the human consumption, in particular in certain tropical areas of Africa and Latin_America . The kind of *Phaseolus* was cultivated in Algeria since of hundreds years, in particular in the areas subhumides and semi-arid.

Bacteria isolated starting from the nodules from leguminous plant from the *Phaseolus* kind are characterized by a phenotypical study based on morphological and farming characters thus the search for specific enzymes (hydrolysis of urea, cellulose activity, reduction of nitrates, pectinolytic activity and of hydrolysis of lecithin) which gives a description comparable with that of *Rhizobium* .d' other share, the study of the enzymes ensuring the fermentation of certain sugars; Mannitol, Citrate of Simmons was carried out.

The abiotic study of factor, the pH emphasizes as the growth of the isolates is observed as well with pH close to acidity as with the pH alkaline.

Key words: *Phaseolus*, isolates, *Rhizobium*.

ملخص

الفصوليا (*Phaseolus*)، من البقوليات الغنية بالنشاء و البروتين و تلعب دورا هاما في النظام الغذائي للإنسان في بعض المناطق الاستوائية في افريقيا و امريكا اللاتينية. هذا النوع *Phaseolus* زرع في الجزائر منذ مئات السنين خصوصا في المناطق الشبه الرطب و الشبه الجافة.

و تتميز البكتيريا المعزولة من عقيدات البقوليات جنس *Phaseolus* من خلال الوصف المظهري علي اساس الصفات المورفولوجية و الزراعية و البحثية عن انزيمات معينة) , *pectinase, lécithinase, nitrate réductase* , *uréase* , *cellulase* الذي يعطي وصفا مشابها لبكتيريا *Rhizobium*..

من ناحية اخرى قمنا بدراسة الانزيمات التي تضمن تخمر بعض السكريات *Mannitol-mobilité, citrate de* *Simmons, TSI*

كما ان الدراسة الغير حيوية لدرجة الحموضة تبين ان نمو العزلات يكون اقرب للحموضة من القاعدية.

الكلمات المفتاحية , *phaseolus*: عزل بكتيريا *rhizobium* ,

Introduction

Introduction

L'azote est un facteur limitant majeur de la production agricole, alors que l'atmosphère terrestre est constituée à 80% d'azote. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire (N_2) est une molécule très stable, que seuls les organismes appartenant au groupe des procaryotes (mais aucun organisme eucaryote) sont capables de le réduire sous une forme combinée assimilable. Les systèmes fixateurs les plus efficaces sont des symbioses qui réalisent un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse.

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

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* ; la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous famille des *Papilionoideae*. Le genre *Phaseolus* est un parmi les plus répandu dans le monde ; deux espèces sont rencontrées en Algérie : *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus coccineus*.

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein desquels ils réduisent l'azote de l'air. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte. Cette symbiose *Rhizobium*-Légumineuse (actuellement dénommée Symbiose Légumineuse-BNL selon de Ladjudie, 1998 a) fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, et joue donc un rôle écologique et économique considérable.

En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Tel que, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*,

Azorhizobium, Methylobacterium, Bradyrhizobium, Blastobacter, Devosia, Burkholderia, Ralstonia. (De Ladjudie et al., 1998)

Dans l'objectif de notre travail, nous sommes intéressées à l'étude des souches de *rhizobium* vis-à-vis à la production des certains enzymes impliquant dans le processus de la nodulation et l'effet de pH sur la croissance de la bactérie.

Le présent mémoire est indiqué selon le plant suivant:

- Introduction
- Revue bibliographique
- Matériel et méthodes
- Résultats et discussion
- Conclusion

Chapitre 1

Revue Bibliographique

I-Les légumineuses**I.1- Généralité**

Les légumineuses sont des angiospermes, appartenant au phylum des Rosales, ce phylum comprend, outre les légumineuses, les Crassulacées, les Rosacées et de nombreuses familles secondaires. Elles sont très souvent séparées en trois sous-familles (Niehaus *et al.*, 1998, Forsberg et Carlson, R. W, 2000) les *Mimosacées*, les *Césalpinacées*, les *Papilionacées*. C'est une famille extrêmement diversifiée que l'on rencontre depuis le crétacé dans les régions chaudes et tempérées du globe. Elle comprend 750 genres et 20000 espèces (Rendle, 1979, Allen, O.N and Allen, E, K, 1981).

Dans la classification des légumineuses, il apparaît les trois sous-familles :

- Les *Mimosoideae*

Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (*Glycine*, *Acacia*...). (Maxted et Bennett, 2001).

-Les *Caesalpinioideae*

Comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23% seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les rhizobia. (Maxted et Bennett, 2001).

-Les *Papilionoideae*

Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995 rédigés par Ziada et Bellir, 2014). Elles sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisum sativum* L.) et le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.); mais aussi pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage. (FAO, 1996).

La légumineuse a un grand intérêt pour l'homme qui utilise ses produits comme aliments, gommes, teintures, résines, huiles et nombreux bois de construction. Aussi certaines espèces de cette famille peuvent contracter une symbiose avec une bactérie du genre *Rhizobium*, pour permettre un accès privilégié à l'azote de l'air. Par cette symbiose, les plantes de cette famille s'affranchissent de la teneur en azote dans le sol. Ainsi ces plantes sont capables de s'adapter à des sols très pauvres, et très dégradés (Il faut rappeler que trèfles et luzernes étaient employés sur les sols en jachère, dans la

rotation des cultures). (Fernand Wathman, 1967). Ces plantes ont donc un rôle améliorateur des sols, en plus d'un intérêt alimentaire.

I.2-lePhaseolus

I.2.1-Description morphologique et botanique

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



Figure1. La plante du genre *Phaseolus* pris de champs de benzouit (Skikda, 2015).

Le haricot est originaire d'Amérique Latine et Centrale où il a été domestiqué depuis plus de 8000 ans (Gepts et, Debouck, 1991, Chacón et al, 2005).

La distribution géographique de l'haricot dans des zones très diversifiées, tant de point de vue climatique que de point de vue Pédologique, en ont fait une culture adéquate pour des systèmes agro-cultureaux très variés. (Woolley et, Davis, 1991, Belay et al, 2009).

I.2.2- Taxonomie

La section *Phaseolus* du genre *Phaseolus* est la plus importante et regroupe notamment les cinq espèces cultivées : *P. acutifolius* A. Gray., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greenm. Et *P. vulgaris* L. (Maréchal et al., 1978, Freytag et, Debouck, 2002, Gepts et al., 2008).

- **Règne** : Végétal
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotyledones
- **Ordre** : Fabales
- **Famille** : Fabaceae
- **Genre** : *Phaseolus*

II-Le cycle d'azote

L'atmosphère terrestre est composée à près de 80% de N_2 . L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques (les acides aminés et protéines, en particulier (Zahran, 1999).

Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (J.J. Drevon, 2004). L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des microorganismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée, et le cycle recommence.

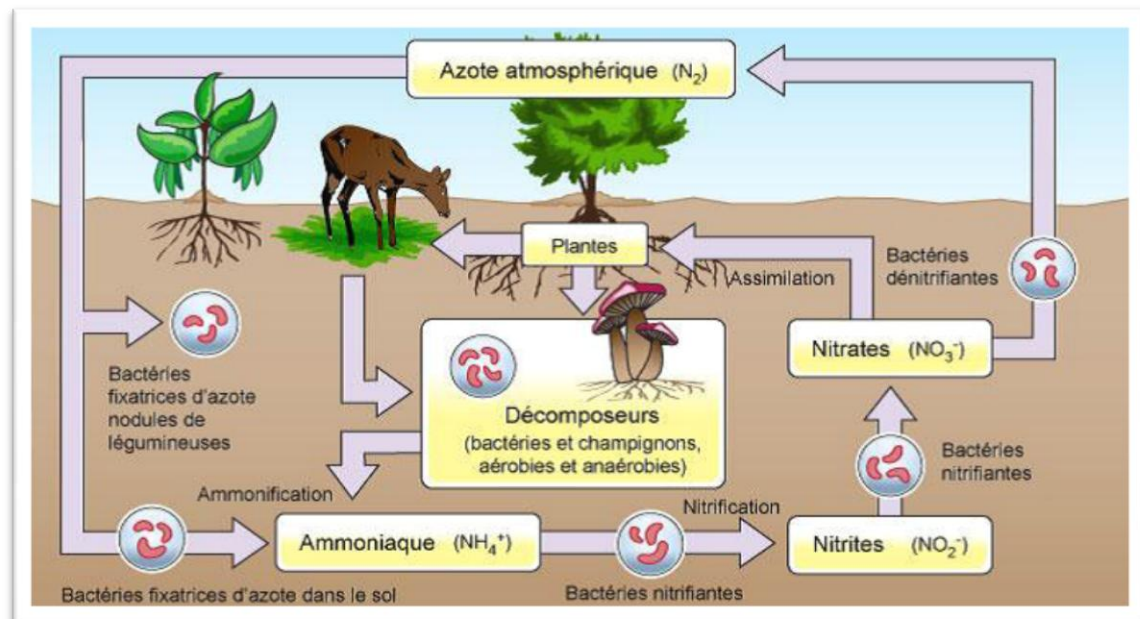


Figure 2.Processus microbiens impliqués dans le cycle de l'azote (UVED, 2005)

II.1-La fixation industrielle

On peut produire de l'engrais azoté à partir de l'azote de l'air par la réaction de **Haber-Bosh** : $H_2 + N_2 \rightarrow NH_3$.

Le dihydrogène est produit à partir de gaz naturel (CH_4), l'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates. Il faut l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par le processus Haber-Bosch, On produit environ 40 millions de tonnes d'ammoniac par le procédé Haber/Bosh par année. C'est environ 1/5 de ce qui est produit par les bactéries fixatrices d'azote sur toute la planète.

II.2-La fixation biologique

C'est le processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est une réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH_3). Cette forme de N combiné, appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné

a- Les fixateurs libres

Il existe des bactéries libres qui vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, soit seules, soit en symbiose avec d'autres bactéries. Ce sont principalement:

- Des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas* (Gillis *et al.*, 1989, Becking, 2006, Steenhoudt et Vanderleyden, 2000).
- Des bactéries anaérobies : *Clostridium*... (Asami et Kiwamu, 2006).

b- Les fixateurs symbiotiques

Directement via la plante dans le cas d'associations plantes-microorganismes. C'est le système associant des plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries à Gram négatif, communément et collectivement appelées les rhizobies ou bactéries nodulant les légumineuses :BNL (Franche *et al.*, 2009).

III–*Rhizobium***III.1-Principales caractéristiques**

Les rhizobies sont des bactéries asporulées ; aérobies anaérobies facultatives (Pelmon, 1993) se sont des microorganismes à Gram négatif ; très mobiles, elles sont jeunes, se présentent en coccobacilles ou en bâtonnets (Jordon, 1984) de 0.6 à 0.8 µm de large sur 1 à 4 µm de long, rencontrés dans le sol sous forme libre ou en bactériodes à l'intérieur des nodosités .

Les rhizobies produisent une gomme hydrosoluble abondante qui, par hydrolyse donne le glucose et chez des nombreuses souches de l'acide galacturonique, ce produit gommeux pourrait intervenir en tant qu'agent agrégatif dans le sol (Dommergues *et al.*, 1970) elle se développe bien dans un milieu correctement aéré. On distingue deux formes de bactérie :

La forme végétative : les bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire, Celles à croissance lente ou par deux à six flagelles et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994), pour les rhizobies à croissance rapide.

La forme bactéroïde: à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobies se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers comme Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, (Somasegaran et Hoben, 1994).



Figure3. Morphologie de *Rhizobium trifolii* (Dazzo, 1995)

III.2-Taxonomie des rhizobiums

Les rhizobies furent isolés pour la première fois par Beijerinck qui nomma la bactérie qu'il isola *Bacillus radicicola*. Ces bactéries furent par la suite renommées *Rhizobium* (Sahgal et Johri, 2003). La première classification des rhizobies a été réalisée sur la base des groupes d'inoculation croisée ; elle comportait un seul genre ; le genre *Rhizobium* avec six espèces : *R. leguminosarum* ; *R. meliloti* ; *R. trifolii* ; *R. phaseoli* ; *R. lupini* et *R. japonicum*. (Zakhia et al., 2001, Sahgal et Johri, 2003) Sur la base de la vitesse de croissance in vitro, les *Rhizobium* ont été ensuite reclassés en deux groupes : groupe des bactéries à croissance rapide et celui des bactéries à croissance lente.

Tableau 1 : classification des *rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014)

| Genre espèce | Source d'isolement |
|-----------------------------------|--|
| Class: Alphaproteobacteria | |
| Order: Rhizobiales | |
| Family: Rhizobiaceae | |
| Genus: Rhizobium | |
| <i>R. leguminosarum</i> | |
| <i>Symbiovar viciae</i> | <i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i> |
| <i>Symbiovar trifolii</i> | <i>Trifolium pratense</i> |
| <i>Symbiovar phaseoli</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>R. galegae</i> | <i>Galega, Leucaena</i> |
| <i>Symbiovar officinalis</i> | <i>Galega orientalis</i> |
| <i>Symbiovar orientalis</i> | <i>Galega officinalis</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>Symbiovar mimosae</i> | <i>Mimosa affinis</i> |
| <i>Symbiovar phaseoli</i> | <i>Phaseolus</i> |

| | |
|----------------------------|--|
| <i>R. undicola</i> | <i>Neptunianatans</i> |
| <i>R. gallicum</i> | <i>Phaseolusvulgaris</i> |
| <i>Symbiovarphaseoli</i> | <i>Phaseolusvulgaris</i> |
| <i>Symbiovargallicum</i> | <i>Phaseolusvulgaris</i> |
| <i>R. giardinii</i> | <i>Phaseolusvulgaris</i> |
| <i>Symbiovarphaseoli</i> | <i>Phaseolus</i> |
| <i>Symbiovargiardinii</i> | <i>Phaseolusvulgaris</i> |
| <i>R. hainanensis</i> | <i>Desmodiumsinuatum, Centrosema, etc.</i> |
| <i>R. huautlense</i> | <i>Sesbania herbacea</i> |
| <i>R. mongolense</i> | <i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i> |
| <i>R. yanglingense</i> | <i>Amphicarpaea</i> |
| <i>R. larrymoorei</i> | <i>Ficus benjamina</i> |
| <i>R. indigoferae</i> | <i>Indigoferaspp.</i> |
| <i>R. sullae</i> | <i>Hedysarum</i> |
| <i>R. loessense</i> | <i>Astragalus, Lespedeza</i> |
| <i>R. cellulosilyticum</i> | <i>Populus alba</i> |
| <i>R. miluonense</i> | <i>Lespedeza</i> |
| <i>R. multihospitium</i> | Plusieurs espèces de légumineuses |
| <i>R. oryzae</i> | <i>Oryzaalta</i> |
| <i>R. pisi</i> | <i>Pisumsativum</i> |
| <i>R. mesosinicum</i> | <i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i> |
| <i>R. alamii</i> | <i>Arabidopsisthaliana</i> |
| <i>R. alkalisoli</i> | <i>Caraganaintermedia</i> |
| <i>R. tibeticum</i> | <i>Trigonellaarchiducis-nicolai</i> |
| <i>R. tubonense</i> | <i>Oxytropisglabra</i> |
| <i>R. halophytocola</i> | usine de dunes côtières |
| <i>R. radiobacter</i> | * |

| | |
|--|--|
| <i>R. rhizogenes</i> | * |
| <i>R. rubi</i> | * |
| <i>R. vitis</i> | * |
| <i>R. nepotum</i> | * |
| Genus: Ensifer | |
| <i>E. meliloti</i> | <i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i> |
| <i>E. fredii</i> | |
| <i>symbiovarfredii</i> | <i>Glycine, Vigna, Cajanus</i> |
| <i>symbiovarsensis</i> | <i>Glycine</i> |
| <i>E. sahelense</i> | <i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i> |
| <i>E. terangae</i> | les plantes hôtes différentes |
| <i>symbiovaracaciae</i> | <i>Acacia</i> |
| <i>symbiovar sesbania</i> | <i>Sesbania</i> |
| <i>E. medicae</i> | <i>Medicagotruncatula, Melilotus</i> |
| <i>E. arboris</i> | <i>Acacia, Prosopis</i> |
| <i>E. kostiense</i> | <i>Acacia, Prosopis</i> |
| <i>E. xingianense (Formerly: Sinorhizobiumxingianense)</i> | <i>Glycine max</i> |
| <i>E. adhaerens</i> | * |
| <i>E. kummerowiae</i> | <i>Kummerowia stipulaceae</i> |
| <i>E. americanum</i> | <i>Acacia</i> |
| <i>E. mexicanus</i> | <i>Acacia angustissima</i> |
| <i>E. numidicus</i> | <i>Medicagosativa</i> |
| Genus: Shinella | |
| <i>S. kummerowiae</i> | <i>Kummerowia stipulaceae</i> |
| Family: Phyllobacteriaceae | |
| Genus: Mesorhizobium | |
| <i>M. loti</i> | <i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i> |
| <i>M. huakuii</i> | <i>Astragalussinicus</i> |
| <i>M. ciceri</i> | <i>Cicer arietinum</i> |
| <i>M. tianshanense</i> | <i>Glycyrrhizapallidiflora</i> |
| <i>M. mediterraneum</i> | <i>Cicer arietinum</i> |

| | |
|---|---|
| <p><i>M. plurifarium</i></p> <p><i>M. amorphae</i></p> <p><i>M. chacoense</i></p> <p><i>M. septentrionale</i></p> <p><i>M. temperatum</i></p> <p><i>M. thiogangeticum</i></p> <p><i>M. albiziae</i></p> <p><i>M. caraganae</i></p> <p><i>M. gobiense</i></p> <p><i>M. tarimense</i></p> <p><i>M. australicum</i></p> <p><i>M. opportunistum</i></p> <p><i>M. metallidurans</i></p> <p><i>M. alhagi</i></p> <p><i>M. camelthorni</i></p> <p><i>M. abyssinicae</i></p> | <p><i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis, Amorpha fruticosa Prosopis alba Astragalusadsurgens Astragalusadsurgens *</i></p> <p><i>Albziakalkora Caraganaspp. Wild legumes Wild legumes Biserrulapelecinus Biserrulapelecinus Anthyllis vulneraria Alhagi Alhagi sparsifolia.</i></p> <p>Différents arbres agroforestiers de légumineuses</p> |
| <p><i>M. muleiense</i></p> <p><i>M. hawassense</i></p> <p><i>M. qingshengii</i></p> <p><i>M. robiniae</i></p> <p><i>M. shonense</i></p> <p><i>M. shangrilense</i></p> <p><i>M. silamurunense</i></p> <p><i>M. tamadayense</i></p> <p>Genus: Phyllobacterium</p> <p><i>P. trifolii</i></p> <p>Family: Methylobacteriaceae</p> <p>Genus: Methylobacterium</p> <p><i>M. nodulans</i></p> <p>Genus: Microvirga</p> <p><i>M. lupini</i></p> <p><i>M. lotononidis</i></p> <p><i>M. zambiensis</i></p> <p>Family: Brucellaceae</p> <p>Genus: Ochrobactrum</p> <p><i>Ochrobactrumcytisi</i></p> <p><i>Ochrobactrum lupini</i></p> <p>Family: Hyphomicrobiaceae</p> <p>Genus: Azorhizobium</p> <p><i>A. caulinodans</i></p> <p><i>A. dobereinereae</i></p> <p><i>A. oxalatiphilum</i></p> <p>Genus: Devosia</p> <p><i>Devosianeptunia</i></p> <p>Family: Bradyrhizobiaceae</p> <p>Genus: Bradyrhizobium</p> <p><i>B. japonicum</i></p> <p><i>B. elkanii</i></p> <p><i>B. liaoningensese</i></p> <p><i>B. yuanmingense</i></p> <p><i>B. betae</i></p> <p><i>B. canariense</i></p> <p><i>B. iriomotense</i></p> <p><i>B. jicamae</i></p> <p><i>B. lablabi</i></p> <p><i>B. huanghuaihaiense</i></p> | <p><i>Cicer arietinum</i></p> <p>Différents arbres agroforestiers de légumineuses</p> <p><i>Astragalussinicus Robiniapseudoacacia</i></p> <p>Différents arbres agroforestiers de légumineuses</p> <p><i>Caragana espèce Astragalus espèce Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i></p> <p><i>Trifolium pratense</i></p> <p><i>Crotalaria spp.</i></p> <p><i>Lupinus sp.</i></p> <p>hôte légumineuse Different</p> <p>hôte légumineuse Different</p> <p><i>Cytisus Lupinus albus</i></p> <p><i>Sesbania rostrata Sesbania virgata</i></p> <p><i>Neptunianatans</i></p> <p><i>Glycine max, Glycine soja Glycine max Glycine max Glycine max Lespedeza Betaevulgaris Genistee et Loteae Entadakoshunensis Pachyrhizuserosis Lablabpurpureus Glycine max</i></p> |

| | |
|---|---|
| <i>B. cytisi</i> <i>B. daqingense</i> <i>B. denitrificans</i> <i>B. oligotrophicum</i> <i>B. pachyrhizi</i> Class: Beta Proeobacteria Order: Burkholderiales Family: Burkholderiaceae Genus: Burkholderia | <i>Cytisus villosus</i> <i>Glycine max</i> <i>Aeschynomene</i> <i>Pachyrhizuserosus</i> |
| <i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. nodosa</i> <i>B. sabiae</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. rhizoxinica</i> <i>B. diazotrophica</i> <i>B. endofungorum</i> <i>B. heleia</i> <i>B. symbiotica</i> Genus: Cupriavidus <i>C. taiwanensis</i> Class: Gamma-Proteobacteria Order: Pseudomonadales Family: Pseudomonaceae <i>Pseudomonas</i> sp. | Vertisolmicroaggregates <i>Alysicarpusglumaceus</i> <i>Aspalatuscarnosa</i> <i>Machaeriumlunatum</i> <i>Mimosa bimucronata</i> , <i>Mimosa scabrella</i> <i>Mimosa caesalpiniifolia</i> <i>Mimosa</i> spp. <i>Rhizopusmicrosporus</i> <i>Mimosa</i> spp. <i>Rhizopusmicrosporus</i> <i>Eleocharisdulcis</i> <i>Mimosa</i> spp. <i>Aspalatuscarnosa</i> <i>Mimosa</i> sp. <i>Robiniapseudoacacia</i> |

*Espèces Avec aucune capacité de nodulation décrit inclus dans traditionnellement considérés comme des genres de rhizobium.

IV-L'interaction *rhizobium*-légumineuse

La symbiose légumineuse/rhizobia, décrite pour la première fois par Frank (1889), est un processus généralement très spécifique (Pelmont, 1995), indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobias pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement (Raven et al., 2000).

L'optimisation de la symbiose exige la présence dans la rhizosphère des souches compatibles, compétitives et infectives qui sont hautement efficaces pour la fixation de l'azote et présentes en nombre suffisant pour maximiser la nodulation (Vessey et al., 2006).

La nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des flavonoïdes (Rasanen, 2002). Ce signal, une fois perçu par le *Rhizobium*, induit l'activation des gènes *nod*, cela conduit à la production des facteurs Nod (lipo-chitoooligosaccharides (LCOs)) qui vont eux-mêmes en retour induire la réponse de la plante et l'initiation de la colonisation par la bactérie (Lindstrom et al. 2010). (Figure 4)

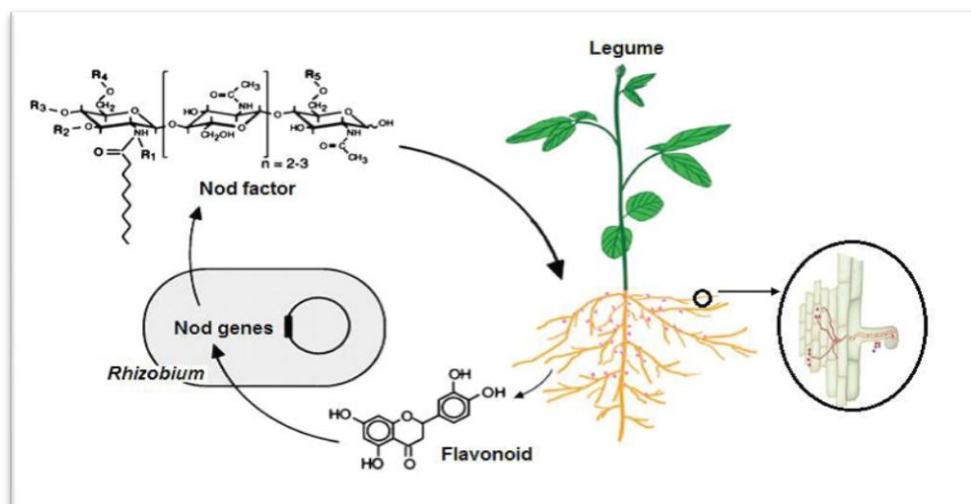


Figure 4: Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse Nod-dépendant (Lindstrom *et al.* 2010).

Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire.

IV.1- Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Dardanelli *et al.*, 2000). Les facteurs Nod émis par les rhizobia, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de Ca^{2+} . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression des gènes spécifiques (Pelmont, 1995; Gage, 2004) et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les rhizobia (Esseling *et al.*, 2003).

L'infection qui s'accompagne d'une digestion de la paroi cellulaire du poil racinaire peut avoir lieu à travers les poils absorbants, les blessures, ou l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). (Figure 5)

IV.2-Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Une fois que les parois des cellules de poils sont digérées, une structure tubulaire appelée le fil d'infection est formée. Elle se compose de cellules de la paroi nouvellement synthétisée qui formeront le matériel entourant le *Rhizobium*. Le centre du tube est une glycoprotéine contenant quelques produits bactériens et quelques glycoprotéines de la plante hôte (Gage, 2004). Ces changements sont causés par des altérations significatives dans le cytosquelette de la plante. La dépolymérisation de l'actine est l'un des effets observés dans les poils absorbants suite à l'exposition au facteur Nod (Gage et Margolin, 2000).

Les bactéries prolifèrent à l'intérieur du cordon et vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales, via ce cordon, provoquant ainsi l'apparition du méristème dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes ou endosymbiose (Lindström et *al*, 2002). Ces dernières ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod, par contre ils se concentrent dans la production des nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique. Ils ont séparés du cytoplasme végétal par une membrane spéciale «péri bactéroïdes» ou membrane de séquestration servant de plaque d'échange entre les bactéries et les cellules de la plante hôte.

Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments appelés « le hémoglobine », synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Corbière, 2002). L'action de l'hémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Rasanen, 2002 ,Simms et Taylor, 2002).

(Figure 5)

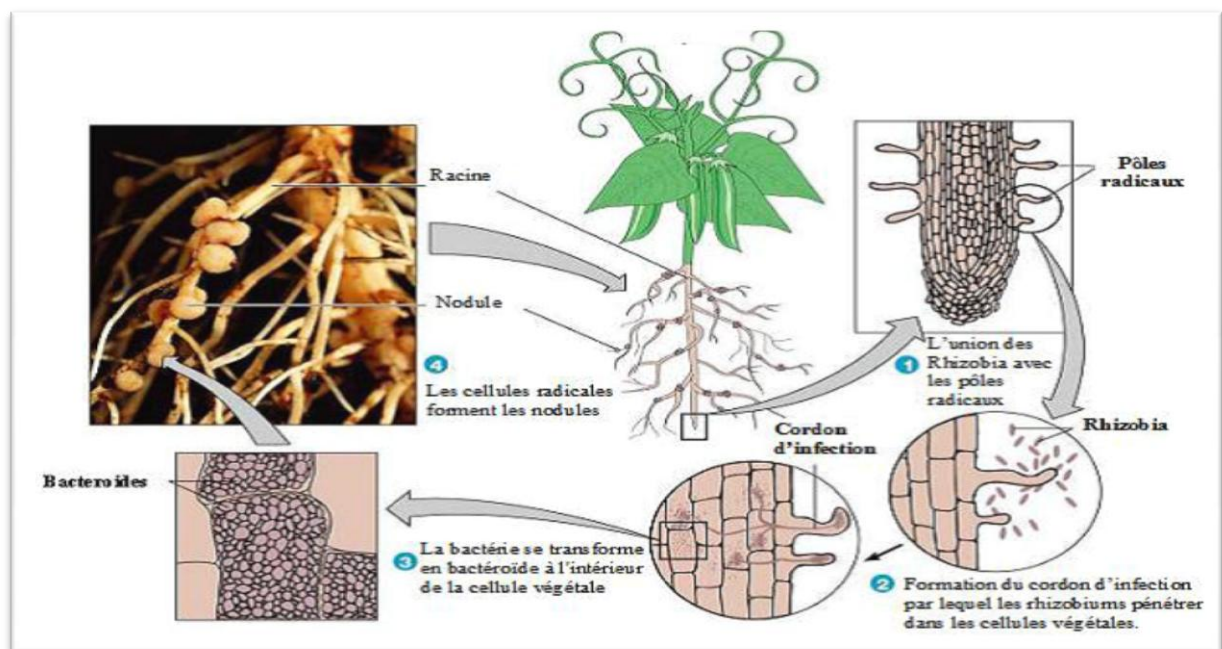


Figure5 :Différentes étapes de la nodulation (Parsons et Day, 1990).

IV.3-Génétique de la fixation et de nodulation

En général, trois types de gènes symbiotiques interviennent dans le processus de nodulation et de fixation azotée chez la bactérie. Il s'agit des gènes *nod* incluent des

gènes communs et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) (Broughton *et al.*, 2000 ,Spaink, 2000).

En 2000, au total 13 gènes de nodulation étaient déjà connus, ce sont des opérons *nod ABCIJ*, *nod FEL*, *nod MNT*, du *nodO* et du *nod D* (Perret *et al.*,2000) des gènes *nif* codant pour la nitrogénase et des gènes *fix* indispensables pour la fixation de l'azote. Chez la plupart des rhizobia (*Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium etc.*), ces gènes symbiotiques sont situés sur un grand plasmide symbiotique appelé pSym (Mercado-Blanco et Toro, 1996 ; Noel, 2009).

IV.3.1-Gène *nod D*

Le gène *nod D* négocie les premières étapes de la nodulation chez la bactérie. Il est par conséquent le premier gène *nod* transcrit. Sa transcription se fait de manière constitutive (Geurts et Bisseling, 2002) et l'activation de son produit, le Nod D, est réalisée par les flavonoïdes. Une fois activé, le Nod D se lie aux sites régulateurs des opérons porteurs des autres gènes *nod* et active leur transcription.(Figure 6)

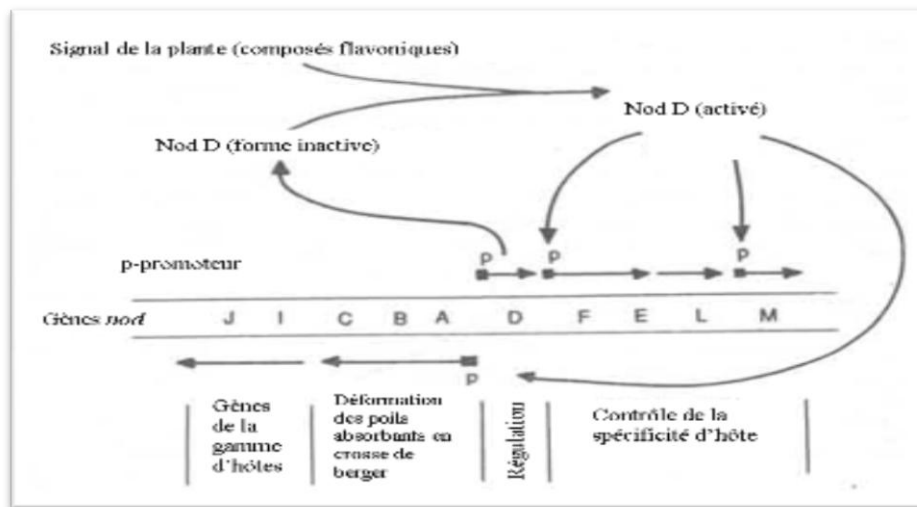


Figure6: Différents types de gènes *nod* (Anonyme, 2010)

a-Gènes *nod* communs (ABCIJ)

Les gènes *nod* communs (*nod A*, *B*, *C*, *I* et *J*) sont des gènes situés sur un opéron duquel les *nod ABC* sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces de rhizobia et leurs mutations provoquent une perte complète de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes. (Brewin *et al.*, 1992 ,Pelmont, 1995).

b-Gènes *nod* spécifiques (*nod H*, *nodFE*, *nod G*, *nod MN*, *nod Q* etc.)

Les gènes *hsn* (*host specific nodulation*) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter (Pelmont, 1995). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (Sharma *et al.*, 1993). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante (Davet, 1996). Leur mutation provoque un retard, une réduction de la nodulation ou une modification de leur spécificité d'hôte (Debelle et Sharma, 1986 ; Debelle *et al.*, 1986; Horvath *et al.*, 1986 ; Cervantes *et al.*, 1989).

Après leur transcription, les gènes *nod* produisent des enzymes qui contrôlent la synthèse de molécules indispensables au processus de nodulation. Ces signaux, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod, sont des molécules lipo-chito-oligosaccharidiques (LCOs) (Terefework, 2002). La synthèse du noyau lipooligosaccharide de ces molécules est contrôlée par les gènes *nod ABCD* tandis que les gènes *hsn* assurent les diverses substitutions de celles-ci (Debelle *et al.*, 2001).

c- Autres gènes nécessaires à la nodulation

En plus des gènes *nod*, les rhizobia possèdent d'autres gènes essentiels au processus de nodulation. Il s'agit des gènes *exoexopolysaccharides* (EPS), *lps*leslipopolysaccharides et les α -glucans(*ndv*)qui codent pour l'expression et la synthèse des molécules de structure de la surface bactérienne (Broughton *et al.*, 2000 ,Spaink, 2000). Elles sont par ailleurs considérées comme d'importants facteurs dans l'efficacité symbiotique.

En effet, les α -glucans sont majoritairement des molécules du périplasme qui permettent la croissance des bactéries sous des conditions hypoosmotiques (Pfeffer *et al.*, 1994). Ils jouent également un rôle important dans la suppression du déclenchement du mécanisme de défense par les phytoalexines chez l'hôte (Bhagwat *et al.*, 1996). Quant aux exopolysaccharides, ils fonctionnent comme des messagers pendant l'infection (Gonzalez *et al.*, 1996).

Enfin, les mutants de *rhizobi* défectifs en la synthèse ou à faible production de lipopolysaccharides n'ont pas la capacité d'induire la formation de cordons d'infection. Ils perdent également leur capacité compétitive ou forment des nodosités incomplètement développées (Lagares *et al.*, 1992).

IV.3.2- Gène *nif*

Les gènes *nif* existent chez plusieurs bactéries dont les rhizobia (Young et Haukka, 1996). Chez ces derniers, ces gènes codent pour la synthèse d'un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote et connu sous le nom de nitrogénase ou dinitrogénase (Hopkins, 2003). Ce complexe enzymatique est constitué de deux métalloprotéines de tailles différentes : le site de la réduction du substrat correspondant à la MoFe-protéine ou dinitrogénase (245 KDa) et le donneur d'électrons correspondant à la Fe protéine ou dinitrogénase réductase (64 KDa).

La Fe-protéine est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques codé par le gène *nifH*. Quant à la Mo-Fe-protéine, elle est un tétramère composée de deux sous unités non identiques de type $\alpha_2\beta_2$ (Werner, 1992, Hopkins, 2003). Celle-ci est codée par les gènes *nifD* et *nifK*. (Figure 7)

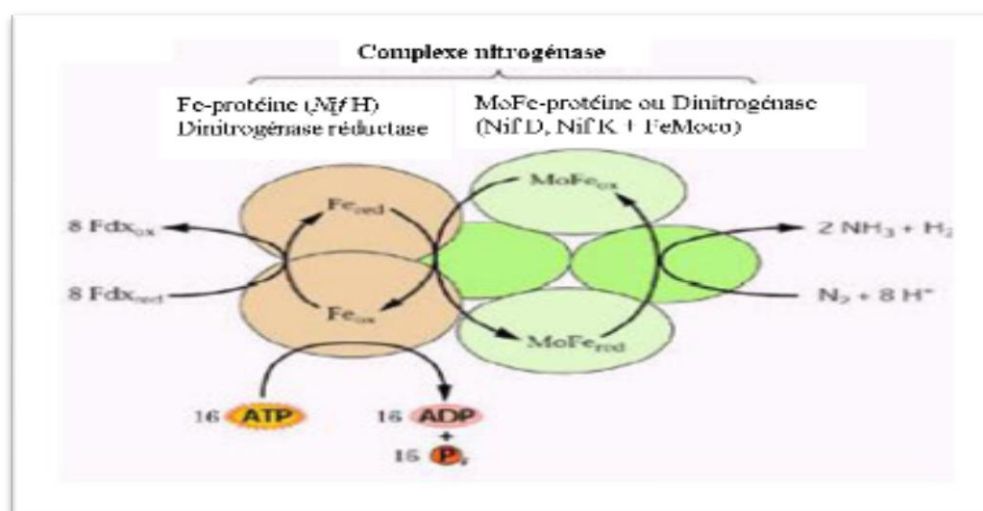


Figure 7 : Nitrogénase et mécanismes d'action (Yann, 2006)

Sous catalyse de ce complexe enzymatique, la réduction de l'azote moléculaire se déroule en deux étapes. Lors de la première, la Fe-protéine est réduite par un donneur primaire d'électrons, habituellement la ferrédoxine. Dans la seconde étape, la Fe-

protéine réduite transfère les électrons à la Mo-Fe-protéine qui catalyse à la fois la réduction du diazote gazeux et la production d'hydrogène (Hopkins, 2003). (Figure7)

L'ATP dans la réaction provient de la respiration aérobie des bactéroïdes. Il réagit avec la Fe-protéine réduite et intervient dans le transfert des électrons entre la Fe-protéine et la Mo-Fe-protéine. Pour chaque molécule de diazote réduite, au moins 16ATP sont nécessaires, deux par électron (Hopkins, 2003). Au total, les légumineuses utilisent jusqu'à 22% de l'énergie issue de leur photosynthèse pour réaliser la fixation azotée dont l'équation générale est la suivante:



À la fin de la réaction, l'ammoniac fixé est converti en glutamine, asparagine, uréides etc. avant d'être transporté dans la sève du xylème pour son assimilation par la plante hôte. Cette conversion est possible grâce aux gènes *nif* et *fix*, etc. qui codent en partie pour la synthèse de différents enzymes catalyseurs comme le glutamate déshydrogénase, la glutamine synthétase (GS) etc.

IV.3.3- Gènes *fix*

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques et impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée (Brewin *et al.*, 1992 , Hopkins, 2003 , Noel, 2009). Certains de ces gènes (*fix L*, *fix J*) sont des régulateurs de la synthèse du gène *nif A*, intervenant dans la régulation de la synthèse de la nitrogénase (Noel, 2009). D'autres encore (*fix NOPQ*) codent pour la synthèse d'enzymes catalysant la régulation de l'oxygène lors de la fixation comme la *cbb3* cytochrome oxydase.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

I-Isolement et purification des isolats

I.1- l'isolement des isolats

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, J.M. (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar YMA, (Vincent, J.M, 1970) additionné de rouge Congo (Annexes 1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. (Tableau 2)

Tableau 2: isolats et des souches de référence utilisée pour cette étude

| | Souches | Plante- hôte | Origine géographique | Source |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| A ₆ | <i>Rhizobium sulae</i> AI | <i>Hedysarum Coronarium</i> | Constantine, Algérie | A.Benguedouar-Constantine |
| Mezo | <i>Mesorhizobium ciceri</i> | <i>Cicerarietinum</i> | Constantine, Algérie | S. Dekkiche- Cne |
| T ₁ | Notre étude | <i>Phaseoluscoccinieu</i> s | Skikda(Tammalous), Algérie | Cetteétude |
| T ₂ | Notre étude | <i>Phaseoluscoccinieu</i> s | Skikda(Tammalous), Algérie | Cette étude |
| S ₁ | Notreétude | <i>Phaseoluscoccinie</i> us | Guelma (Salah Salah), Algérie | Cette étude |
| S ₂ | Notreétude | <i>Phaseoluscoccinie</i> us | Guelma (Salah Salah), Algérie | Cette étude |
| m ₁ | Notreétude | <i>Phaseoluscoccinie</i> us | Guelma (Mdjez Ammar), Algérie | Cette étude |
| m ₂ | Notreétude | <i>Phaseoluscoccinie</i> us | Guelma (Mdjez Ammar), Algérie | Cette étude |
| b ₁ | Notreétude | <i>Phaseolus vulgaris</i> | El kol(benzouit), Algérie | Cette étude |
| b ₂ | Notreétude | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Skikda(Benzouit), Algérie | Cette étude |
| z ₁ | Notreétude | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Annaba (Boumaaza), Algérie | Cette étude |
| z ₂ | Notreétude | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Annaba (Boumaaza), Algérie | Cette étude |

I.2-Purification et conservation des isolats

La conservation des souches purifiées est réalisée sur milieu YMA additionné de 3g/l de CaCO₃ (agent tampon) (Vincent, J.M, 1970; Beck D.P., et col. Materon L.A., Afandi F, 1993). Chaque isolat est ensemencé par stries dans des boîtes de Pétri pour une utilisation quotidienne et dans des tubes inclinés pour un usage tardif et une longue conservation allant de 6 mois à une année.

II-Caractères Phénotypiques**II.1- Aspect microscopique (Coloration de Gram)**

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

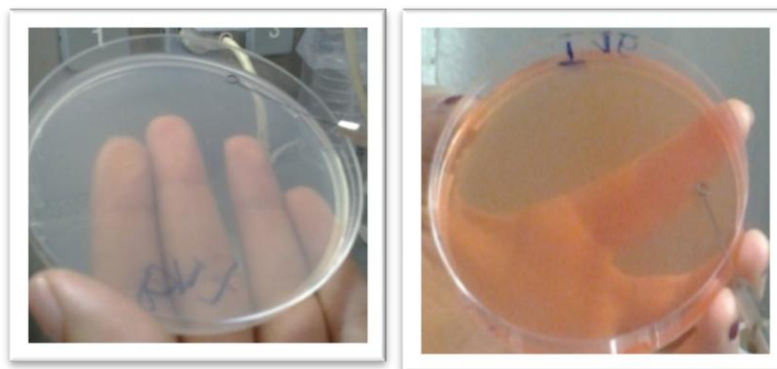
Préparer des frottis à partir des cultures sur YMA, puis colorées selon les étapes suivantes :

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

II.2-Aspect macroscopique**II.2.1- Croissance sur milieu YMA, YMA.RC**

L'aspect macroscopique de colonies est observé sur milieu YMA (Annexe 1), YMA Rouge Congo, il doit correspondre à une description selon Vincent J.M, 1970. Et Somasegaran p., et Hoben 1994. Après incubation, les colonies qui apparaissent sur ce milieu sont examinées pour un certain nombre de caractères morphologiques : L'aspect des colonies, leur couleur et leur viscosité.

Les colonies prise en considération sont celles qui absorbent peu ou pas le rouge Congo (Jordan D. C, 1982.et Jordan D. C,1984.), (Somasegaran p., et Hoben, 1994). Celles-ci sont observées au microscope optique après une coloration de Gram.

**A: Sur YMA****B: Sur YMA +RC****Figure 8.** Technique d'ensemencement

II.2.2-Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB

Les Bactéries Nodulantes des Légumineuses BNL, 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*,...) (Jordan, 1984). Pour cela, nos isolats et les souches témoin sont cultivés sur le milieu YMA + Bleu de BromoThymol (BTB) (Annexes 1). Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu qui fait virer sa couleur vers le bleu, alors que les bactéries à croissance rapide effectuent une réaction acide qui change la couleur verte le jaune (Somasegaran et Hoben, 1994)

III-Tests biochimiques

III.1-Recherche des enzymes spécifiques

Les souches nodulantes de la légumineuse *Phaseolus* synthétisent certains enzymes jouant un rôle fondamental lors des différents stades de la symbiose hôte-bactérie, notamment la nodulation des racines de légumineuse. Les isolats et les souches de référence sont testés pour la production de nitrate réductase, Uréase, cellulase, pectinase...

III.1.1-Rcherche de la nitrate-réductase

Certaines bactéries peuvent assimiler les nitrates comme source d'azote, d'autre les utilisent (ainsi que les nitrites) comme accepteurs de protons et d'électrons (Guiraud, 1998)

La nitrate réductase est mise en évidence par l'incubation du bouillon TY (Annexe 1) contenant 0.1% de nitrate de potassium KNO₃ (p/v), (Beringer J.E, 1974)

Après incubation à 28°C pendant 5 jours sous agitation, on rajoute 3 à 4 gouttes des réactifs ; nitrate réductase I (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et nitrate réductase II (α -naphtylamine dans l'acide acétique 5M).

L'apparition d'une coloration rouge ou rose dans le milieu indique que les souches ont un nitrate réductase+ (les nitrates sont réduits en nitrites).

En absence de coloration, une pincée de la poudre de zinc est ajoutée au milieu. Si les nitrates sont toujours présents dans le milieu, ils vont être réduits sous l'effet du zinc et la coloration rouge apparaîtra, la réaction est donc réellement négative. Et si les nitrates ont été réduits par les souches en azote gazeux (N₂), le milieu ne contient plus les nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la couleur n'est pas modifiée (Euzéby J.P, 2007); Delarras C, 2007).

III.1.2-Hydrolyse de l'urée

Cette réaction est très complexe. L'uréase est produite par les bactéries uréolytiques. Ces dernières sont présentes dans le sol (Williames P.E.V et all., 1984); (Yomeogo-Bougouma Vet all., 1993)

Il est mis en évidence en cultivant les isolats sur milieu YMA, contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012g/l de rouge de phénol (indicateur de pH). La solution d'urée est stérilisée par filtration (= 0.20 μ m) et rajoutée au milieu maintenu à 45°C sous la hotte à flux laminaire.

Après 48h d'incubation à 28°C, la réaction positive se manifeste par un virage de couleur au rose (rose fuchsia) qui représente l'alcalinisation du milieu et l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

III.1.3-Activité cellulosique

Pour détecter la présence d'une activité endoglucanasique chez les BNL, les isolats sont mis en culture sur le milieu YMA contenant 0.25% de Carboxy-Methyl-Cellulose (CMC) pendant 5 jours à 28°C.

Après la période d'incubation les boîtes sont rincées avec l'eau courante puis inondées d'une solution de RC (1mg/ml) et incubées à l'étuve pendant 60min à 28°C, le colorant est ensuite remplacé par une solution de Na Cl 1M en 3 étapes. Les boîtes sont ensuite abandonnées à température ambiante pendant 30min. Si le fond de la boîte présente un halo jaune orangé entourant les colonies indique la présence de la cellulase (Struffi P et all.,1998).

III.1.4- Activité pectinolytique

Pour mettre en évidence l'activité pectinolytique, les souches sont cultivées sur milieu YMA dont le mannitol est remplacé par l'inositol à 0.1% et additionné de 0.2% de pectine (Na-polygalacturanate). Après incubation de 7 jours à 28°C, Les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante et sont inondées d'une solution de rouge de ruthénium 0.05%, qui fait son effet en 30min. Un halo décoloré autour des colonies indique une activité pectinolytique (polygalacturonique).

III.1.5 -L'activité « lécithinasique » (phosphatidyl-choline-estérases)

La lécithine purifiée étant particulièrement coûteuse, la source de lécithine utilisée est le jaune d'œuf qui est incorporé à une gélose ordinaire. D'autres lipides contenus dans le jaune d'œuf rendent la lecture assez délicate. Les différents lipides existent de plus sous forme de complexes lipoprotéiques qui rendent de milieu opaque. L'action de lipoprotéinases rendrait les lipoprotéines beaucoup plus solubles : l'élimination de la protéine, ou d'une partie de celle-ci, modifierait les propriétés de solubilité du complexe, les phospholipides assurant la solubilité des lipides constituant le cœur des lipoprotéines, d'un point de vue technique, cette action se traduit par une clarification de la gélose autour de la strie d'ensemencement. Cette action est précoce et peut être masqué par une lécithinase ou une lipase(Figure).

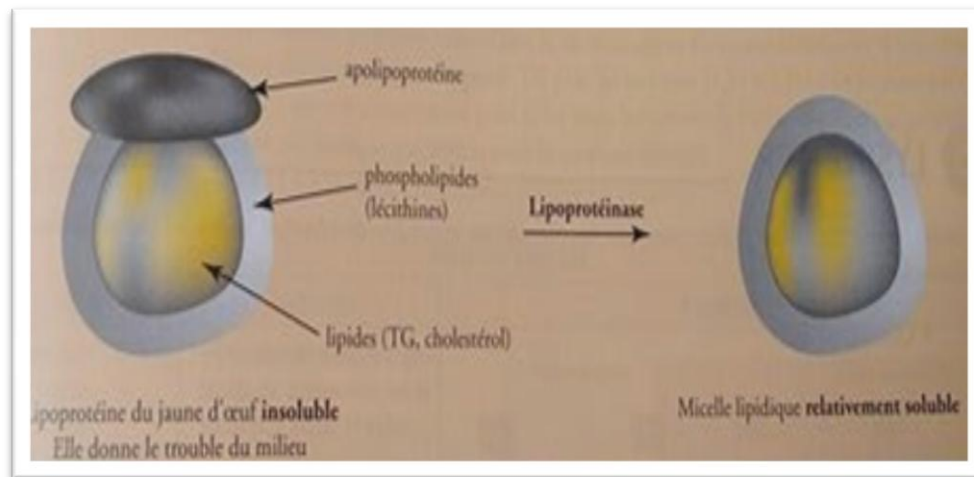


Figure 9. Schématisation de l'action des lipoprotéinases (Jean-noeol, Joffin Guy Leyral, 2006)

Dans un deuxième temps, deux cas sont possibles :

-L'action d'une lécithinase sans lipase libre de la choline soluble et un diglycéride peut être soluble qui précipite dans le milieu provoquant un trouble dont les limites n'excèdent pas celles de la zone transparente précédente : la strie d'ensemencement est alors entourée d'une zone opaque car celle-ci ne dépasse pas les limites de la colonie

-L'action d'une lipase sans lécithinase conduit à la précipitation d'acides gras caractérisés par des cristaux d'aspect soyeux et macré. L'activité d'une lipase peut conduire à des erreurs de lecture : elle peut être prise pour une lécithinase et masquer une lipoprotéine-lipase. Pour éviter ces erreurs, on retiendra que l'opacification résultant de l'activité lipasique est limitée à la surface du milieu et qu'elle est moins importante que celle produite par une lécithinase ((Jean-noeol Joffin Guy Leyral., 2006).

Si les deux enzymes sont présentes l'aspect lécithinase primera probablement :

Gélose trypticose –soja additionnée de jaune d'œuf stérile dilué au 1/2 en eau

Physiologique (concentration Final 10% soit 2,5ml pour 25 ml milieu)

Selon le Protocole précis (Delarras, 2007), ce milieu de culture est préparé en ajoutant 2ml, d'une émulsion de jaune d'œuf et d'eau physiologique à 0,85% stérile à 20 ml de gélose nutritive, fondue et ramenée à 47+/- 2°C: couler dans des boîtes de Pétrie et laisser solidifier.

On Ensemencer en point avec la ou les souches à étudier, incubé pendant 1 à 5 jours à 30 ou 37°C suivant les souches bactériennes à tester.

La gélose au jaune d'œuf, permet de détecter la lécithinase, mais également la lipase et lipoprotéinase, les observations effectuées autour des colonies sont rapportées dans le (tableau 3).

Cependant l'observation et l'interprétation de ces activités enzymatiques s'avèrent souvent délicates, surtout lorsque la bactérie étudiée possède une lécithinase et une lipase.

Tableau 3: Aspect des colonies sur la gélose au jaune d'œuf et enzymes détectées

| Aspect autour des colonies sur boîtes de Pétri | Enzymes détectées |
|--|--------------------|
| -Halo d'éclaircissement autour de la colonie apparaissant en premier | - Lipoprotéinase + |
| - Halo opaque blanc jaunâtre, bord net sous la colonie ou en limite | -Lécithinase + |
| - Pas halo | -Lécithinase – |

III.2- Fermentation des sucres**III.2.1-Sur milieu mannitol- mobilité**

Ensemencer le milieu (Annexe1) par piqure centrale. Ce milieu permet d'apprécier à la fois la mobilité d'une bactérie qui se traduit par un envahissement plus au moins grand de la totalité du milieu changement de couleur (rouge..... Jaune).



Figure10. Technique d'ensemencement du milieu Mannitol-Mobilité.

III.2.2-Sur milieu TSI (Triple-Sugar-Agar)

Ce milieu contient un mono-holoside qui est le glucose et deux Diholoside qui sont le lactose et le saccharose, rouge de phénol comme indicateur de PH et sel de fer.

On ensemence la pente par des stries longitudinales ; et le culot par une piqûre centrale. Incuber à 37°C pendant 24h.

-Si la bactérie fermente le glucose (glucose+)le culot devient jaune

-Si la bactérie utilise le saccharose et le lactose la pente devient jaune

-Si la bactérie produit le H₂S, cette production se traduit par un noircissement dans le milieu du tube

-S'il y a la production d'une ou plusieurs poches de gaz, la bactérie est productrice soit de CO₂ soit H₂, ou bien les deux.

III.2.3 -Sur milieu Citrate de Simmons

La plupart des acides organiques qui jouent un rôle dans le métabolisme bactérien sont impliqués dans les grandes voies métaboliques d'oxydation ou fermentation; il est préférable de les étudier en même temps quels glucides(Annexe 1)Le catabolisme du citrate nécessite l'action des enzymes du cycle de Krebs :

Aconitase, isocitrico-deshydrogénase,... il faut aussi que la bactérie possède un citrate perméase permettant le franchissement par les citrates de membrane bactérienne.

On ensemence en strie centrale sur le milieu de Simmons qu'on incube à 30-37°C pendant 1-10 jour en observant les résultats tous les jours.

Le résultat positif se manifeste par alcalinisation du milieu qui devient bleu.

En effet, le milieu est tamponné de manière à absorber les ions acides constamment libérés par le métabolisme, L'ion ammonium est dissocié le premier quand un excès d'acide est apparu ; sa combinaison sous forme de phosphate est plus labile que celle du sodium. Le changement de couleur de l'indicateur signale l'apparition de la base libérée.

VI-Effet du pH sur la croissance des isolats

Pour tester l'influence du pH sur la croissance. Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB (Annexe 1) à 28°C à différent pH : 4, 4.5, 5, 5.5, 8, 9, 10, 11.

La croissance des isolats pour chaque pH est déterminée par la mesure de la densité optique ($\lambda=600$ nm), après deux temps d'incubation t24 h, t48h.

V- Extraction d'ADN Génomique Bactérien

L'extraction de l'ADN total destiné à l'amplification par PCR, a été réalisée à partir des colonies bactériennes cultivées sur milieu gélosé YMA à 28°C pendant 24 à 48 heures. Les cellules jeunes ont été traitées à la protéinase K (Laguerre et *al.*, 1997). L'équivalent d'environ 10 μ l de cellules (une oëse métallique pleine) est mis en suspension dans 200 μ l de tris HCl à 5mM (pH 8,2) auquel est ajouté 10 μ l de protéinase K à 1.3 mg/ml d'eau milliQ. Ce mélange est incubé à 55°C pendant une nuit, puis la

protéinase K est dénaturée à 100°C pendant 10 min. Ces cellules traitées peuvent être conservés plusieurs semaines à -20°C .

C'est à partir de cette suspension cellulaire, utilisée comme ADN cible, qu'ont été effectuées les différentes réactions de PCR.

Chapitre 3

Résultats et discussion

I-Isolement et purification des isolats

Au départ, l'isolement et la purification des isolats nous ont permis d'obtenir 10 souches qui répondent aux critères des *Rhizobium* (Gram -, forme de coccobacilles et non absorbance du rouge Congo).

II -Caractères phénotypique**II.1-Aspect microscopique (Coloration de Gram)**

La coloration de Gram a révélé que l'ensemble de nos isolats testes sont des Cocco bacilles bien isolées de couleur rose, à Gram négatif (Figure 15), compatible avec l'aspect microscopique desrhizobia.

La coloration de Gram a permis également de vérifier la pureté de la culture.

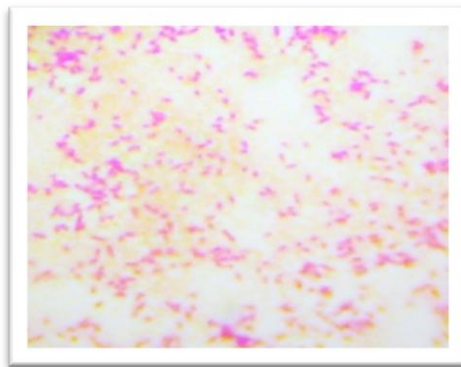


Figure 11 : Observation microscopique des bactéries de forme coccobacilles à Gram négatif (Objectif X100).

II.2-Aspect macroscopique**II.211- Croissance sur milieu YMA, YMA +RC**

Après 48h d'incubation, l'isolement des isolats fait sortir des colonies lisses, brillantes, translucides avec une consistance crémeuse et visqueuse et couleur blanchâtre sur YMA (figure 12)

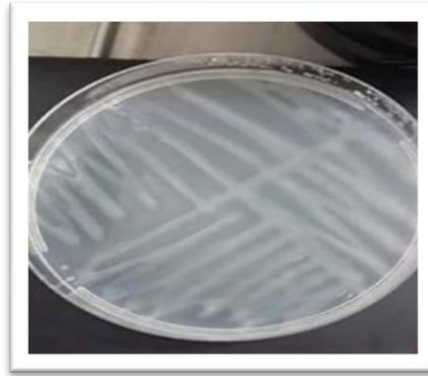


Figure 12 : Aspect des colonies bactériennes sur YMA(S2)

Ainsi les bactéries absorbent très peu le Rouge Congo en les mettant (bactéries) sur YMA RC.(Vincent., 1970 ; Jordan., 1984)(Figure 13)

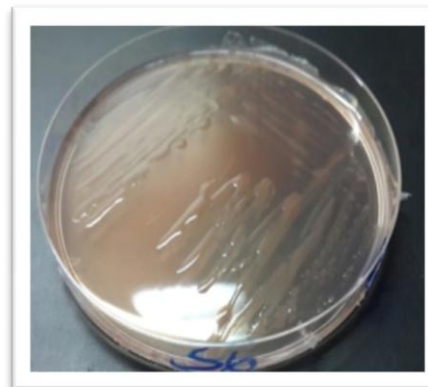


Figure 13 :Aspect des colonies sur YMA.RC (S1)

II.2-1-Test de la vitesse de croissance sur milieu BTB

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des Bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du Bleu de Bromothymol(BTB) vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Virage de culture au bleu) (Jordan., 1984 ; Beck et *al.* 1993; Pagano., 2008).

Dans cette étude tous les isolats y compris les souches de référencesont à croissance rapide. (Figure 14)



Figure 14: Acidification du milieu YMA+BTB (B1)

III- Tests biochimiques

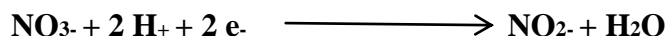
III.1-Recherche des enzymes spécifiques

III.1.1-Recherche de la nitrate-réductase

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (EL-Hilali, 2006). La réduction des nitrates ou des nitrites constituent l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin et *al.*, 2006, Lucinski et *al.*, 2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïde.

Après 5 jours d'incubation en rajoutant les réactifs 1 et 2 du nitrate réductase, la totalité des isolats réduit les nitrates en donnant une couleur rouge, sauf les deux isolats T1 et B1 est toujours inchangé. Nous avons donc ajouté de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase, pour vérifier la présence des nitrates dans le milieu ou non. Après quelques minutes on n'observe aucun virement de la couleur, donc le milieu ne contient plus les ions nitrates indiquant ainsi un résultat positif.

La croissance des isolats et souches témoins sur milieu à base de KNO_3 et après addition de réactifs de la nitrate-réductase, montrent la présence de l'enzyme. (El Essawi et Abdelghaffar, 1967, Lindstrom et Lehtomaki., 1988, Struffi *et al.*, 1998). (Figure 16). La coloration rouge ou rose traduit la décomposition des nitrates en nitrites.



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

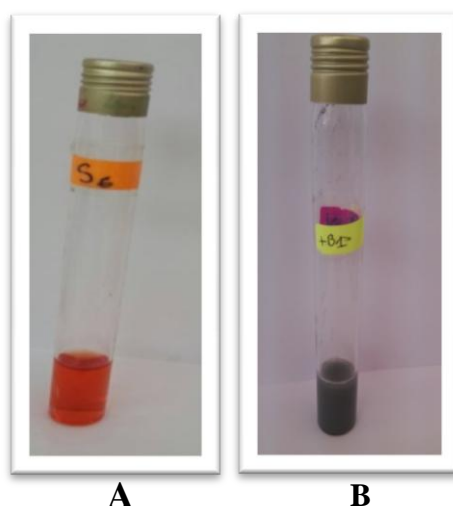


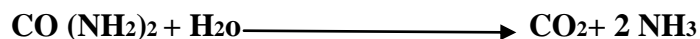
Figure 15 :Test de nitrate réductase positif A : S1 après l'ajout de deux réactif

B : B1 après l'ajout de Zinc

III.1.2-Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et al(1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de coloration du milieu.

Les isolats Mezo, T1, T2, B2, Z1, Z2, S1, S2, M1, alcalinisent fortement le milieu par un virage de couleur au rose fuchsia, Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération d'ammoniac (Uréase +) (Figure), (Guiraud, 1998)



Par contre les autre isolats B1, A6 et M2, ont tous présentées une acidification marquée par un virage de couleur de l'orange rouge ver le jaune (Uréase -) (Figure 17).

**Figure 16:A-Test Uréase négatif (A6)****B- TestUréase positif (T2)**

III.1.3-Activité cellulosique

Les *Rhizobium* sécrètent deux glucanases extracellulaires, plyA et plyB, qui peuvent dégrader la carboxy-méthyl-cellulose (CMC), qui est utilisée comme un substrat modèle de la paroi des polymères de cellulose de cellules végétales. Lorsqu'il est cultivé sur gélose, la dégradation de la CMC s'est produite seulement directement en dessous des colonies de *Rhizobium*, ce qui suggère que les enzymes restent attachés à la bactérie (Christine F et *al.*, 1998).

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la Cellulose, l'apparition d'un halo jaune orange autour des colonies indique la présence D'une endoglucanase (cellulase), presque tous les isolats ont présenté une réaction positive sauf les deux isolats (B1 et B2) qui ont donné un résultat négatif. (Figure 18)

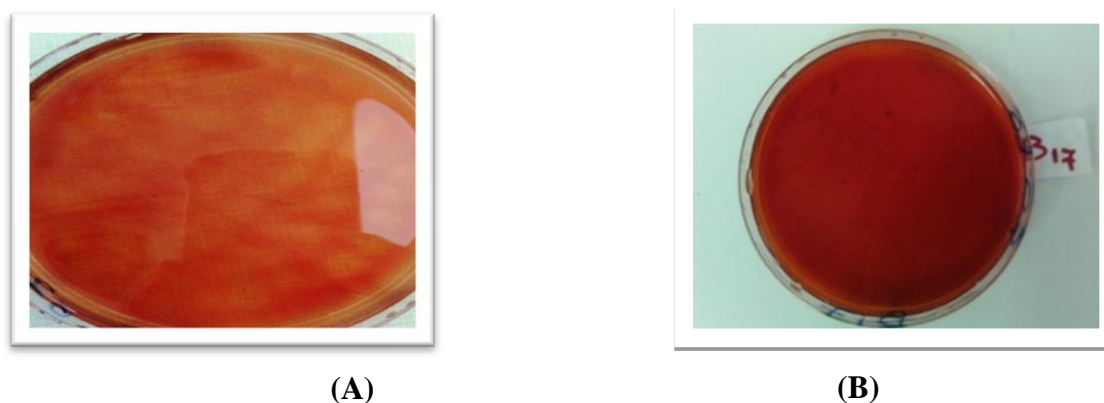


Figure 17 :A-Test cellulase positif (Z2) B-Test cellulase négatif (B2)

III.1.4-Activité pectinolytique

Après le rinçage avec de l'eau et addition du rouge de ruthénium, un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive, Tous les isolats disposent d'une activité poly-galacturonasique (Figure 19).

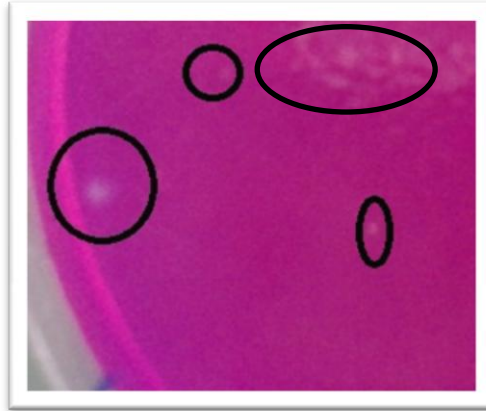


Figure 18:Test pectinase positif (Z1)

III.1.5- Test d'hydrolyse de la lécithine

Après 5 jours d'incubation, les souches de références et nos isolats montrent un résultat négatives sauf l'isolat T2 qui fait révéler la présence d'un Halo claire autour de la colonie indiquant la présence de lipoprotéinase qui va rendre les lipoprotéines beaucoup plus solubles, et un Halo opaque blanc jaunâtre, bord limité et net sous la colonie, ce qui confirme que cette isolat possède la lécithinase qui dégrade la lécithine. (Figure 20)



Figure 19 :Test lécithinase positif (T2)

III.2- Fermentation des sucres**III.2.1-Mannitol-Mobilité**

Après incubation tous les isolats disposent un résultat positif (Mannitol+), donc, ces bactéries capables de fermenter le mannitol rendent le pH acide et le Rouge de Phénol fait passer le milieu du rouge au jaune. (Figure 21)



Figure 20 : Résultat de Mannitol- Mobilité positif

III.2.2-Sur milieu TSI (Triple-Sugar-Agar)

TSI, C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence la fermentation du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H_2S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. L'absence de noircissement du culot indique l'absence de H_2S . Ces résultats sont observés pour tous nos isolats.(Figure 21)

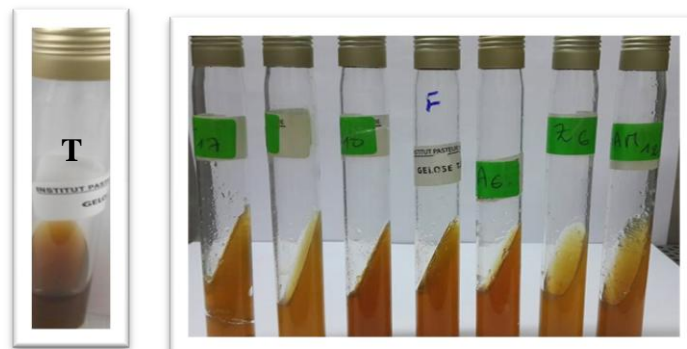


Figure21: TestTSI positif

III.2.3-Sur milieu Citrate de Simmons

A la lumière des résultats obtenus les bactéries ainsi isolées des légumineuses, ne présentent aucune culture, donc les bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone (Citrate-). (Figure 22)

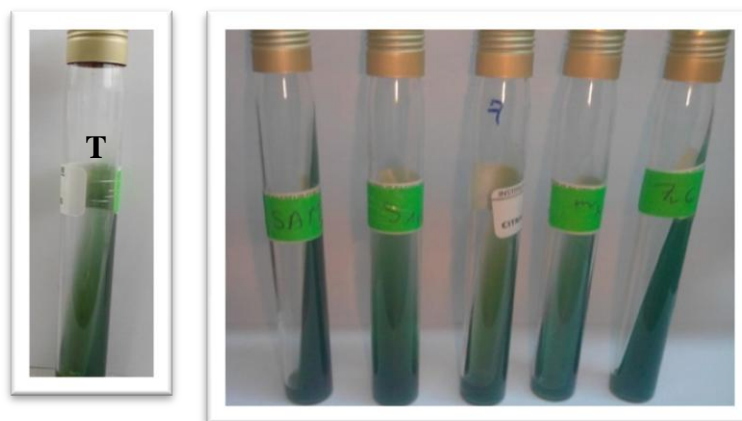


Figure 22: Test Citrate de Simmons négatif

IV-Effet du pH sur la croissance des isolats

La mesure de la DO de la croissance des isolats cultivés sur le milieu YMB ajusté à des pH différents a été effectuée après 24h et 48h d'incubation.

Après 24h d'incubation les isolats et le souche témoin tolèrent les différents pH notamment à pH 9 et 11, sauf la souche Mezo qui tolère très faiblement les différents pH.

L'isolat S1 a montré une faible croissance à pH 10 et 11, et pour B2 aussi moins tolère à pH 5,5. (Figure 24)

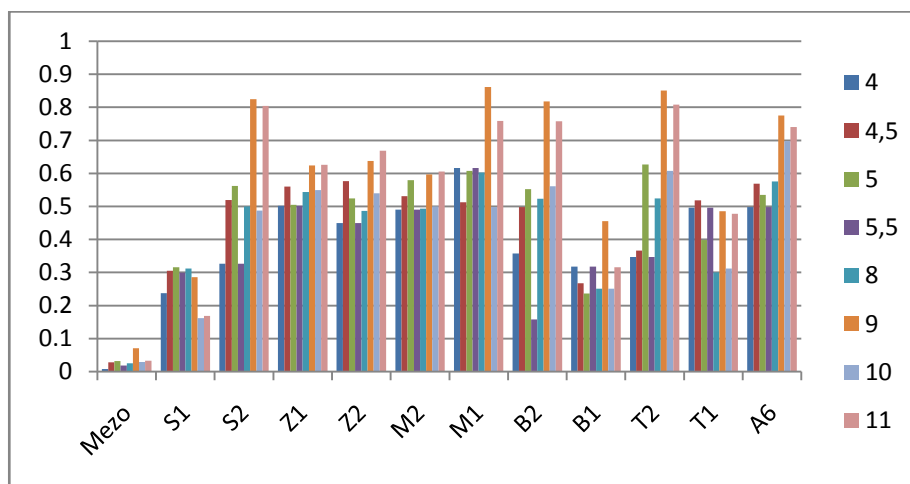


Figure 23 : Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 24h

Après 48h d'incubation (figure 25), la souche Mezo poussé à pH 5,5 et S1 montre une faible croissance aux pH 5 et 5,5. 8 et 11, ainsi que la souche B1 à pH 9.

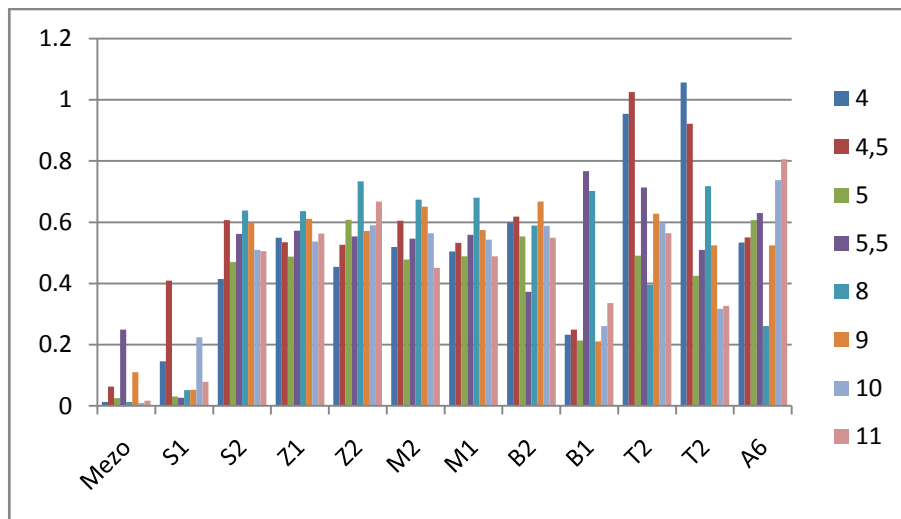


Figure 24: Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 48h

Jordan en 1984 a montré que les rhizobies à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité. D'après Graham et al (1994) les rhizobies tolérants aux pH acides sont généralement plus performants en conditions d'acidité du sol dans le champ. Donc, la sélection de souches de rhizobium plus tolérantes au faible pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité (Correa et Barneix, 1997).

D'après nos résultats, les souches étudiées ont généralement un taux de croissance rapide et sont globalement tolérantes à l'alcalinité et majoritairement tolérantes à l'acidité. Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Raza et al (2001) qui ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH de 4 à 10 et sont en accord aussi avec ceux d'EL-Hilali (2006) et Gaci (2010).

Vincent (1970) et Jordan (1984), ont constaté que le pH optimum de croissance des rhizobies est entre 6 et 7. Le pH optimal pour la croissance des rhizobies peut varier, en général ce sont des bactéries neutrophiles (EL-Hilali, 2006).

V- Extraction d'ADN Génomique Bactérienne

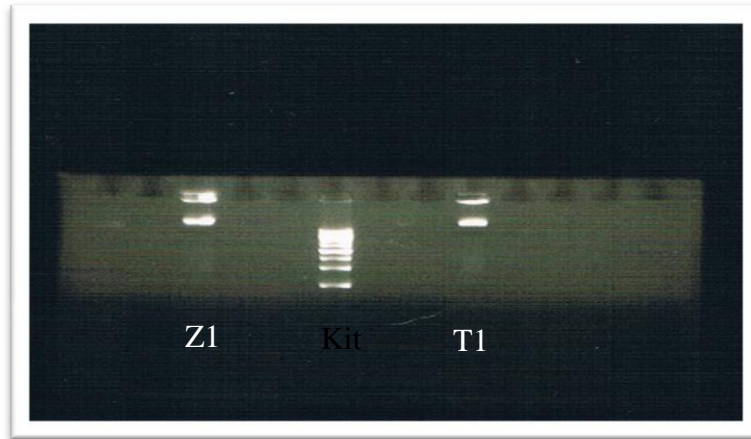


Figure 25. Profil d'électrophorèse d'ADN génomique

On remarque que le génome de deux souches :Z1et T1 à la même taille (environ 12000Pb).

conclusion

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse du genre *Phaseolus* cultivé en Algérie, dans différentes régions et de les caractériser en présence de deux souches témoins : *Mesorhizobium cicer* (Meso), et *Rhizobium sulae* (A6). Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux rhizobies (selon Vincent, 1970, Somasegaran et Hoben, 1994, Jordan, 1984).

À la lumière des résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques, les isolats se comportent pratiquement comme des rhizobies (morphologie des colonies sur YMA, vitesse de croissance *Rhizobium*, présence des enzymes spécifiques

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

Toutes les souches y compris celles de référence sont douées d'une activité uréasique, polygalacturonique, cellulolique (ces deux derniers sont impliqués dans le processus infectieux des racines de la Légumineuse par les isolats. Par ailleurs un enzyme impliqué dans le processus de fixation et transformation de l'azote atmosphérique est retrouvé chez toutes les souches (Nitrate-réductase) (Beck et col, 1993).

Une fermentation préférentielle de quelques sucres a été examinée, selon nos résultats, tous les isolats utilisent le Mannitol, le Glucose, le Saccharose, et le Lactose comme source de carbone. Or les mêmes isolats, ne présentent aucune culture sur le milieu Citrate de Simmons, Les bactéries n'utilisent pas le Citrate comme seule source de carbone (Citrate-).

Selon les résultats de lécithinase, toutes nos souches donnent des résultats négatifs sauf l'isolat T1 positif possède l'enzyme de lécithinase qui fait dégrader la lécithine.

- Nous avons évalué la tolérance de tous les isolats vis-à-vis à un facteur de stress le pH, la croissance des isolats est observée aussi bien à pH voisin de l'acidité qu'aux pH alcalins.

Références

Références bibliographiques

- Allen, O. N. and E .K. Allen, 1981.** The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison
- Asami S, Kiwamu M, 2006.** *Evaluation of the Nitrogen-fixing Ability of Endophytic Clostridia based on Acetylene Reduction and ReverseTranscription-PCR targeting the nifH Transcript and Ribosomal RNA.* Microbes and Environments. 21: 23–35.
- Belay D, Schulthess F, Omwega C, 2009.** The profitability of maize–haricot bean intercropping techniques to control maize stem borers under low pest densities in Ethiopia. *Phytoparasitica* 37:43-50.).
- Becking J, 2006.**The family *Azotobacteraceae*. *Prokaryotes*. 6: 759–783.
- Berrada. H etBenbrahim. K, 2014.** *Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives.* British Microbiology Research Journal 4(6): 616-639.
- BrewinN.J., Downie J.A. & Young J.P.W, 1992.** Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology, M.R JoshaLederberg.Rockefeller University New York, 3*, 239-248.
- Broughton W. J., Jabbouri S. &PerretX, 2000.** Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.*, **182**, 5641-5652.
- Bhagwat A.A., Gross K.C., Tully R.E. &Keister D, 1996.**Glucan synthesis in *Bradyrhizobiumjaponicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing α -(1 6) linkages. *J. Bacteriol.*, **178**, 4635-4642.
- Beringer J. E., 1974.** *R factor transfer in Rhizobium leguminosarum.* J. Genet. Microbiol 84,188-198.
- .Beck D.P., Materon L.A., Afandi F, 1993.** *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual.* ICARDA. Syria

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

Corbière H.L.F, 2002. The importance of sucrose synthase for AM symbiosis in maize, in pea and in Medicago .Thèse de doctoratAndriankaja, 200 p.

Correa O. SetBarneix A.J, 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*.*World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 153-157.

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

Dardanelli M, Angelini J et Fabra A, 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Canadian journal of microbiology*49: 399-405.

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

Dazzo F.B, 1995.[http:// commtechlab.msu.edu/sites/dlc.me/zoo/zdr,010.html](http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc.me/zoo/zdr,010.html)

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

Delarras C, 2007. Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne. In *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. TEC &DOC, EM inter; pp126-172. ISBN.:978-2-7430-0945-8.

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

Esseling J.J., Lhuissier F.G.P et Emons A.M.C, 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988.

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

Euzéby J.P, 2007. Abrégé de bactériologie générale et Médicale à l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse (En ligne) Disponible sur « <http://www.bacteriologie.net> »

El Hilali I, 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 Mohamed V-AGDAL. Rabat. 189p.

Forsberg, L. S., and Carlson, R.W, 2000. Varying the Abundance of O Antigen in *Rhizobium etli* and its Effect on Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **182**, 5317-5324.]

Frank, B, 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 7: 332-346.

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

Freytag GF, Debouck DG, 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *Sida Bot Misc* 23. Botanical Research Institute of Texas.

FAO, 1996. Tunisie. Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO.

Franché C, Lindström K, Elmerich C, 2009. *Nitrogen-fixing bacteria associate with leguminous and non-leguminous plants.* Plant Soil. 321: 35–59.

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

Gaci M, 2010. Isolement et caractérisation des bactéries autochtones, nodulant les légumineuses, piégées à partir de l'habitat naturel de la légumineuse *Pisum sativum* L.

Gepts P, Francisco JL, Aragão Everaldo de Barros, Matthew W. Blair, Rosana Brondani, 2008. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), Genomics of Tropical Crop Plant. Springer, pp. 113-143).

Gage D et Margolin W, 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology* 3(6): 613.

Gage D.J, 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2): 280-300.

Guiraud J.P, 1998. Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

Gepts P, Debouck D, 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7-53. In A. van Schoonhoven and O. Voysest (ed.) Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Intl, Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia.

Gonzalez J.E., Rruhs B. L. &Waleker G.C, 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8636-8641.

Horvatch B., Kondorasi E., Johnson M., SchmidT J., Torok L., Gyorgypal Z., Barabas L., WienkeV., Schell J. &Kondorasi A, 1986. Organization structure and syrnbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specilicity for alfalfa. *Cell*, **46**, 335-343.

Hopkins W.G, 2003. Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck, 514 p.

Joffin J.N et Leyval G, 2006. Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4e edition de Scréréen CRDP. Aquitaine, Espagne.

Jordan D.C, 1982. Transfer of rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobiumgen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J.Syst.Bacteriol.* 32: 136-139.

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

Jarvis B.D.W., McIeam T. S, Robertson I.G.C et Fanning G.R, 1977. Phenetic similarityand DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand nativelegumes and Rhizobium strains from agricultural plants. *New Zealand J.Agric. Res.* 20, 42-52.

Jean- Noel Joffin Guy Leyral, 2006. Microbiologie Technique. Tome 1. 4°adition. P184-185.

Lindström K, Terefework Z, Suominen L etLortet G, 2002. Signalling and developmentof Rhizobium-legume symbiosis. biology and environment: *Royal I rish Academy* 102 (1): 61-64.

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

Laguerre G, Van Berkum P, Amarger N, Prévost D. 1997. Genetic diversity of rhizobialsymbionts isolated from legume species within the genera Astragalus, Oxytropis, and Onobrychis. Applied and Environmental Microbiology. **63**: 4748–4758

Lucinski R, Polcyn W et Rotayczak L, 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation insymbiotic association Rhizobium-legumes. *Acta Biochimia Polonia.* 49 (2): 537-546.

Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A., Altier, N, 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. Journal of Microbiology Research 161 :453-463.

MERCADO-BLANCO J. & TORO N, 1996. Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *MPMI.*, **9**, 535-545.

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

Mascherpa JM, Stainier F, 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. *Boisiera* 28: 273.

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

Niehaus K, Lagares A, and A. Pühler, 1998. A *Sinorhizobium meliloti* polysaccharide mutant induces effective nodules on the host

plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicagotruncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 11, 906-914 Noel, K. D.

Ndèye FD, 2002. Utilisation des inoculums de *rhizobium* pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Thèse de docteur de biologie végétale. Pages 97. Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

Noel K.D, 2009. Bacteria Rhizobia. Encyclopedia of microbiology, SCHAECHTER M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA, 3, 877-893.

Parsons R, Day DA, 1990. Mechanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant, Cell et Environment*, 13: 501-512.

Perry J.J, Stalex J.T et Lory S, 2004. Microbiologie cours et questions de révision. Edition Dunod. Paris. France.

Pelmont J, 1995. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Press universitaire de Grenoble.

Pelmont J, 1993. Bactérie et environnement adaptation physiologique. Edition Office des publications Universitaires. Vol2

Rendle, AB The classification of flowering plants. Vol II, Dicotylédons. Vikas publishing House, Pvt(1979). Ltd. India, pp. 348-370.

Perret X., Staehlin C. & Broughton W.J, 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol*, 64, 180-201.

Pagano M.C, 2008. Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, 2008 (11) pp 498-508.

Pfeffer P.E., Becard G., Rolin D.B., Uknalis J., Cook P. & TU S, 1994. In vivo nuclear magnetic resonance study of the osmoregulation of phosphocholine-

substituted-1,3;1,6 cyclic glucan and its associated carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2137-2146.

Raza S, Jornsgard Abou-Taleb, B.H et Christiansen J.L, 2001. Tolerance of *Bradyrhizobium sp.* (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*.

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

Rasanen L, 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlande. 220p.

Sahgal, M .et Johri, B .N, 2003. The changing face of rhizobial systematics. *current Science*. 84 (1): 43-48.).

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

Sprent J.I, 1995. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem* 27(4/5): 401-407.

Skikda, 2015. Phaseolus SB pris de champs de Benzouit

Steenhoudt O, Vanderleyden J, 2000. *Azospirillum. a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses*. Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 487–506.

SPAINK H.P, 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 257-288.

Simms E.L et Taylor D.L., 2002. Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes, and Rhizobia. *Comp. Biol.* 42: 369-380.

Somasegaran P., Hoben H. J. & J. R. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York.

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

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

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

Vessey J.K., Chemining G.N, 2006. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 153-163.

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

Werner D, 1992. Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

Williames P.E.V, Innes G .Met Brewer A, 1984. Ammonia treatment of straw via the hydrolysis of urea. I Effects of dry matter and urea concentrations on the rate of dry matter degradation of urea. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1**:103-113.

Young J.P.W. & Haukka K. E, 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.*, **133**, 87-94.

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

Yomeogo-Bougouma V, Cordesse R, Arnaud A et Inesta M, 1993. Identification de l'origine des uréases impliquées dans le traitement de la paille de blé dur à l'urée et caractérisation de la flore microbienne présente. *Ann ;Zootech.* 42:39-47.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus,B., and de Lajudie, P., 2001: Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* pp 380-395.

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

Ziada. M et Bellir. D, 2014. Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes légumineuses *Pisum sativum* L. cultivée dans différents écosystèmes de l'Est et Centre Algérien. Mémoire de master: Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 55p.

ANONYME. Flavonoids Induce Nodulation, 2010. (Page consultée le 24 Avril 2010) < <http://www.microbiologyprocedure.com/rhizobium-and-legume-root-nodulation/flavonoids-induce-nodulation.html>

Uved.,2005. Cycle de l'azote. Disponible sur http://www.cima.ualg.pt/piloto/UVED_Geochimie/UVED/projet/2/site/html/2/2-5/2-5-3/2-5-3-3.html. Consulté le 21.4.2014.

Annexe

Annexe 1

Milieux de culture et solution utilisés

Composition du milieu YMB (YeastManitolBroth) en g/l. (Vincent, 1970)

| | |
|--|--------|
| Mannitol..... | 10.00 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.50 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O..... | 0.20 |
| Na Cl..... | 0.10 |
| Extrait de levure..... | 0.50 |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| PH..... | 6.8 |

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l. (Vincent, 1970)

| | |
|-----------|--------|
| YMB..... | 1000ml |
| Agar..... | 18 |
| PH..... | 6.8 |

Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

Composition du milieu YMA + Rouge Congo en g/l.

| | |
|------------------------------------|--------|
| YMA..... | 1000ml |
| Solution stock de rouge Congo..... | 10ml |
| Agar..... | 18 |
| PH..... | 6.8 |

Après ajustement du PH on ajoute 10 ml de la solution stock de Rouge Congo (0.25g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillée) au milieu YMA, puis on ajoute l'agar.

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition du milieu YMA + bleu de bromothymol en g/l.

| | |
|---|--------|
| YMA..... | 1000ml |
| Solution stock de bleu de bromothymo..... | 10ml |
| Agar..... | 15 |
| pH..... | 6.8 |

Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

Après ajustement du PH on ajoute 10 ml de la solution stock de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100 ml d'éthanol.), puis on ajoute l'agar.

Composition du milieu TYB (Trypton-Yeast-Agar.) en g /l.

| | |
|-------------------------|--------|
| Tryptone..... | 5 |
| Extrait de levure..... | 3 |
| Cacl ₂ | 0.74 |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| Agar..... | 12 |
| PH..... | 6.8 |

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition du milieu Mannitol- Mobilité en g/l

| | |
|---------------------------|--------|
| Peptone..... | 20 |
| Nitrate de potassium..... | 1 |
| Mannitol..... | 2 |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| Rouge de phénol..... | 4ml |
| Agar..... | 4 |
| PH..... | 8.1 |

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Solution stock de Rouge de phénol (1% c.à.d. 1g dans 100 ml d'eau distillée).

Composition du milieu TSI (Triple- Sugar- Agar) en g/l

| | |
|----------------------------------|--------|
| Peptone..... | 14 |
| Extrait de levure..... | 3 |
| Extrait de viande..... | 3 |
| Lactose..... | 10 |
| Saccharose..... | 10 |
| D-glucose..... | 10 |
| Chlorure de sodium..... | 5 |
| Citrate d'ammonium ferrique..... | 0.3 |
| Thiosulfate de sodium..... | 0.3 |
| Rouge de phénol..... | 0.25 |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Agar.....14

PH.....7.4

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition du milieu citrate de Simmons en g/l.

Sulfate de Mg.....0.2

Phosphate mono-.....1

Phosphate di potassique.....1

Citrate de sodium.....2

Na cl.....5

Bleu de bromothymol.....0.08

Eau distillée.....1000ml

Agar.....12

PH.....6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition du milieu Gélose Nutritive en g/l.

Extrait de viande.....1

Extrait de levure.....1

Peptone.....5

Agar.....15

PH.....7.4

Annexe 2

Tableau du PH après 24h

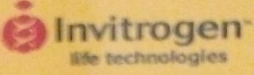
| PH Les souches | 4 | 4.5 | 5 | 5.5 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-------------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|-----------|-----------|
| Mezo | 0.008 | 0.028 | 0.032 | 0.018 | 0.025 | 0.071 | 0.029 | 0.033 |
| A6 | 0.498 | 0.569 | 0.535 | 0.498 | 0.576 | 0.775 | 0.698 | 0.740 |
| S1 | 0.237 | 0.305 | 0.316 | 0.299 | 0.312 | 0.286 | 0.162 | 0.169 |
| S2 | 0.327 | 0.519 | 0.562 | 0.327 | 0.500 | 0.825 | 0.487 | 0.804 |
| Z1 | 0.502 | 0.560 | 0.505 | 0.502 | 0.544 | 0.624 | 0.549 | 0.626 |
| Z2 | 0.450 | 0.577 | 0.524 | 0.450 | 0.486 | 0.638 | 0.540 | 0.669 |
| M2 | 0.490 | 0.531 | 0.579 | 0.490 | 0.493 | 0.597 | 0.500 | 0.606 |
| M1 | 0.616 | 0.513 | 0.608 | 0.616 | 0.603 | 0.861 | 0.498 | 0.759 |
| B2 | 0.358 | 0.498 | 0.552 | 0.158 | 0.523 | 0.818 | 0.561 | 0.758 |
| B1 | 0.318 | 0.267 | 0.236 | 0.318 | 0.251 | 0.455 | 0.251 | 0.316 |
| T2 | 0.347 | 0.366 | 0.627 | 0.347 | 0.524 | 0.851 | 0.608 | 0.808 |
| T1 | 0.496 | 0.518 | 0.398 | 0.496 | 0.300 | 0.485 | 0.312 | 0.478 |

Tableau de PH après 48h

| PH Les souches | 4 | 4.5 | 5 | 5.5 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-------------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|-----------|-----------|
| Mezo | 0.013 | 0.063 | 0.025 | 0.249 | 0.013 | 0.110 | 0.009 | 0.017 |
| A6 | 0.534 | 0.550 | 0.607 | 0.630 | 0.261 | 0.524 | 0.738 | 0.806 |
| S1 | 0.145 | 0.409 | 0.030 | 0.026 | 0.051 | 0.052 | 0.224 | 0.078 |
| S2 | 0.414 | 0.607 | 0.470 | 0.562 | 0.638 | 0.598 | 0.509 | 0.505 |
| Z1 | 0.549 | 0.535 | 0.488 | 0.572 | 0.636 | 0.611 | 0.537 | 0.563 |
| Z2 | 0.454 | 0.526 | 0.608 | 0.553 | 0.733 | 0.571 | 0.590 | 0.667 |
| M2 | 0.519 | 0.605 | 0.478 | 0.546 | 0.674 | 0.651 | 0.564 | 0.451 |
| M1 | 0.504 | 0.532 | 0.489 | 0.559 | 0.680 | 0.574 | 0.543 | 0.489 |
| B2 | 0.599 | 0.618 | 0.553 | 0.372 | 0.589 | 0.668 | 0.588 | 0.549 |
| B1 | 0.232 | 0.249 | 0.213 | 0.767 | 0.702 | 0.210 | 0.261 | 0.336 |
| T2 | 0.954 | 1.025 | 0.491 | 0.713 | 0.395 | 0.628 | 0.600 | 0.564 |
| T1 | 1.057 | 0.922 | 0.425 | 0.510 | 0.718 | 0.524 | 0.317 | 0.326 |

Annexe 3


Kite



Ready-Load™ 1 Kb Plus DNA Ladder

1 Kb Plus DNA Ladder

- 20 Fragments
- 100 bp – 12Kb
- Orientation Doublet
- Ready-to-Load
- 100 Applications
- Store at room temperature



0.9 µg/lane

| Name | Size | Cat.No. |
|---------------------------------|----------|-----------|
| Ready-Load™ 1Kb Plus DNA Ladder | 100 apps | 12308-011 |

Order online at www.invitrogen.com

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE CERTAINES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES ET L'EFFET DU PH CHEZ LES BACTÉRIES NODULANT LES LÉGUMINEUSES DU GENRE *PHASEOLUS*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Résumé

Le Haricot (*Phaseolus*) est une légumineuse riche en amidon et en protéines, joue un rôle important dans l'alimentation humaine, en particulier dans certaines régions tropicales d'Afrique et d'Amérique latine. Le genre de *Phaseolus* a été cultivé en Algérie depuis des centaines d'années, notamment dans les régions subhumides et semi arides.

Des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse du genre *Phaseolus* sont caractérisés par une étude phénotypique basée sur des caractères morphologiques et culturels ainsi la recherche d'enzymes spécifiques (hydrolyse de l'urée, activité cellulolytique, réduction des nitrates, activité pectinolytique et l'hydrolyse de la lécithine) qui donne une description comparable à celle des *Rhizobium*, d'autres part, l'étude des enzymes assurant la fermentation de certains sucres ; Mannitol, Citrate de Simmons ... a été réalisé.

L'étude de facteur abiotique, le pH fait ressortir que la croissance des isolats est observée aussi bien à pH voisin de l'acidité qu'aux pH alcalins.

Mots clés : *Phaseolus*, isolats, *Rhizobium*

Laboratoire de recherche : Biotechnologie

Jury d'évaluation :

Président du jury : Madame *D.SATTA* (professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine)

Rapporteur : Madame *M. SAOUDI* (maitre assistante classe A à l'université des Frères Mentouri Constantine)

Examineur : Madame *S.BECKRI* (maitre assistante classe A à l'université des Frères Mentouri Constantine)

Date de soutenance : 21/06/2016