



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
STÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIF.



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département :** Biologie et Ecologie Végétale

**قسم :** البيولوجيا و علم البيئة النباتية

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biotechnologie

**Spécialité :** Biotechnologies et Génomiques Végétale

Intitulé :

---

**Isolement et caractérisation de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin.**

---

**Présenté et soutenu par :** *TAHKOUBIT Abdelhakim*

**Le :** 25/06/2018

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Mme. BENABDOUN Faiza Meriem - M.C.B à UFM Constantine 1

**Rapporteur :** Mr. TEMAGOULT Mahmoud - M.A.A à UFM Constantine 1

**Examinatrice :** Mme. MAUGAL Rym Tinhinen – M.C.B à INATAA Constantine 1

*Année universitaire  
2017 – 2018*

## Remerciements

En premier lieu, je remercie le bon **Dieu**, tout puissant, de m'avoir donné la force, la volonté et le courage d'accomplir au mieux ce travail.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, Université des Frères Mentouri-Constantine I, sous la direction de Monsieur **M<sup>r</sup> TEMAGOULT Mahmoud**.

J'exprime ma profonde gratitude à **M<sup>r</sup> TEMAGOULT Mahmoud**, Maître-Assistant à l'Université des Frères Mentouri-Constantine I, qui a dirigé mon travail avec beaucoup de rigueur et d'efficacité. Je tiens à lui témoigner ma reconnaissance pour sa disponibilité, les précieux conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

Je remercie **M<sup>me</sup> BENABDOUN Faiza Meriem**, Maître de Conférences à l'Université des Frères Mentouri-Constantine I, pour avoir accepté de présider le jury d'évaluation.

Mes vifs remerciements à **M<sup>me</sup> MAOUGAL Rym Tinhinen** Maître de Conférences à INATAA - Constantine I qui nous a fait l'honneur de vouloir juger ce travail.

Je voudrai également remercier **M<sup>me</sup> NACER Asma** doctorante à l'USTHB, pour ces multiples conseils concernant ce travail.

Je ne saurais oublier l'équipe du Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale notamment **M<sup>r</sup> BELBEKRI Mohamed Nadir**, **M<sup>me</sup> BOULDJEDJ Ryma** et **M<sup>me</sup> ZAHRAOUI Chafika** pour leur aide et leurs encouragements, ainsi que mes amis de promotion tant pour la sympathie qu'ils m'ont toujours manifestée que pour leur collaboration efficace et les encouragements qu'ils m'ont toujours prodigués.

*TAHKOUBIT Abdelhakim*

## Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que **DIEU** les bénisse.

A mes chères sœurs et mes chers frères pour qui je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

A toute la famille Tahkoubit.

ABDELHAKIM

## Liste des abréviations

**ADH** : Arginine dihydrolase.

**ADI** : Adipate.

**API** : Appareillage et Procédé d'Identification.

**ARA**: Arabinose.

**BNL**: Bactérie Nodulant Légumineuse.

**BCP**: Pourpre de bromocrésol.

**CAT** : Catalase.

**CIT** : Citrate.

**ESC** : Esculine.

**GEL**: Gélatine.

**Glu**: Glucose.

**GPA** : Glucose Peptone Agar.

**GNT** : Gluconate.

**Ind**: Indole.

**Lac**: Lactose.

**MAL**: Maltose.

**MAN**: Mannitol.

**MLT**: Acide malique.

**MNE**: Mannose.

**NAG**: N-acetyl-glucosamine.

**NE** : Non entérobactéries.

**Nod** : Nodulation.

**NR** : Nitrate Réductase.

**ODC** : Ornithine décarboxylase.

**ONPG** : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside.

**PAC**: Acide phénylacétique.

**RC**: Rouge Congo.

**TRP**: Tryptophane.

**YMA**: Yeast Mannitol Agar.

**YMB**: Yeast Mannitol broth.

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b>	Cycle de l'azote .....	<b>05</b>
<b>Figure 02 :</b>	Mécanisme de réduction par la nitrogénase de l'azote moléculaire .....	<b>06</b>
<b>Figure 03 :</b>	Taxonomie du genre <i>Medicago</i> .....	<b>10</b>
<b>Figure 04 :</b>	Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S de 15 genres $\alpha$ - <i>protéobactéries</i> .....	<b>12</b>
<b>Figure 05 :</b>	Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé .....	<b>14</b>
<b>Figure 06 :</b>	Localisation géographique des zones de prélèvement des nodules .....	<b>17</b>
<b>Figure 07 :</b>	Prélèvement des nodules .....	<b>18</b>
<b>Figure 08 :</b>	Stérilisation et écrasement des nodules .....	<b>18</b>
<b>Figure 09 :</b>	Ensemencement par la technique des quatre cadrans .....	<b>19</b>
<b>Figure 10 :</b>	Repiquage en milieu liquide sous la hotte .....	<b>19</b>
<b>Figure 11 :</b>	Mode d'emploi sur les galeries .....	<b>22</b>
<b>Figure 12 :</b>	Croissance sur milieu YMA+ RC .....	<b>24</b>
<b>Figure 13 :</b>	Culture bactérienne sur milieu liquide .....	<b>25</b>
<b>Figure 14 :</b>	Observation microscopique des bactéries isolées .....	<b>26</b>
<b>Figure 15 :</b>	Test sur milieu GPA+BCP.....	<b>26</b>
<b>Figure 16 :</b>	Test du 3-cetolactose.....	<b>27</b>

## Liste de tableaux

<b>Tableau 01 :</b>	Estimation des quantités d'azote fixé par différentes légumineuses....	<b>09</b>
<b>Tableau 02 :</b>	Spécificité de la symbiose <i>Sinorhizobium</i> / légumineuse .....	<b>13</b>
<b>Tableau 03 :</b>	Résultats des tests biochimiques -galerie API 20 NE .....	<b>29</b>

## **INTITULÉ : Isolement et caractérisation de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin.**

### **Résumé :**

Le présent travail porte sur l'isolement et la caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* poussant à l'état spontanés en milieu salin. Nous avons choisi comme lieu d'échantillonnage la région de Collo (wilaya Skikda) et les isollements ont été réalisés à partir de dix nodules différents. L'étude des caractères morphologiques et culturels montrent que les bactéries isolées appartiennent au genre *Rhizobium*. Les résultats obtenus par caractérisation biochimique sur galeries *API 20NE* révèle une différence dans le pouvoir d'assimilation des différents substrats ce qui renseigne sur l'existence d'une diversité de l'équipement enzymatique entre les différentes souches isolées.

**Mots clés :** *Medicago truncatula*, *rhizobium*, Milieu salin, nodule.

**TITEL : Isolation and characterization of bacterial strains nodulating  
*Medicago truncatula* legume in saline environment**

**Abstract :**

This work focuses on the isolation and characterization of spontaneously growing nodulating bacteria of the legume *Medicago truncatula* in the saline environment. We chose Collo region (wilaya Skikda) as the sampling site ; and the isolations were made from ten different nodules. The study of morphological and cultural features show that the isolated bacteria belong to the genus *Rhizobium*. The results obtained by biochemical characterization on API 20NE galleries reveal a difference in the assimilation capacity of the different substrates, which indicates the existence of a diversity of enzymatic equipment between the different isolated strains.

**Mots clés :** *Medicago truncatula*, *rhizobium*, saline environment, nodule.

المخلص:

يتناول هذا العمل عزل وتوصيف البكتيريا العقدية لفصاة *Medicago truncatula* النامية بشكل عفوي في البيئة المالحة. اخترنا منطقة القالة (ولاية سكيكدة) كموقع لأخذ العينات وتم العزل من عشرة عقيدات مختلفة. تظهر دراسة الخصائص المورفولوجية والزراعية أن البكتيريا المعزولة تنتمي إلى جنس *Rhizobium*. النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق التوصيف البيوكيميائي على معارض API 20NE تكشف الفرق في الطاقة الاستيعابية للطبقات المختلفة، مما يدل على وجود مجموعة متنوعة من المعدات الأنزيمية بين السلالات المعزولة المختلفة.

كلمات مفتاحية: *Medicago truncatula* ، *Rhizobium* ، العقدية ، وسط مالح



# SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. L'azote .....	03
1.1. Généralités .....	03
1.2. Le cycle de l'azote .....	03
1.2.1. Ammonification, nitrification et dénitrification .....	04
1.2.2. La fixation biologique de l'azote .....	05
1.2.2.1. Les fixateurs libres .....	07
1.2.2.2. Les fixateurs symbiotiques .....	07
2. La symbiose Légumineuses- <i>Rhizobiums</i> .....	08
2. Légumineuses .....	08
2.1. Généralités .....	08
2.2. Classification .....	08
2.3. Importance .....	09
3. La symbiose <i>Medicago truncatula</i> - <i>Sinorhizobium melliloti</i> .....	10
3.1. Le genre <i>Medicago</i> .....	10
3.1.1. <i>Medicago truncatula</i> .....	10
a) Intérêt biologique .....	10
b) Intérêt génétique .....	11
3.2. Les <i>rhizobiums</i> .....	11
3.2.1. Généralités .....	11
3.2.2. Genre <i>Sinorhizobium</i> .....	12
4. Processus de nodulation .....	13
4.1. L'infection et la formation des nodules .....	13
4.2. La régulation du nombre des nodules .....	15
4.3. Spécificité symbiotique .....	15

5. Effets de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuses .....	15
5.1. Effet sur le processus d'infection et le développement des nodules	15
5.2. Effet sur l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire .....	16
6. Intérêt des bactéries nodulants les légumineuses en biotechnologie .....	16

## Chapitre II : MATERIEL ET METHODE

1Matériel biologique .....	17
1. Collecte des nodules .....	17
2. Méthodes .....	18
1. Stérilisation des nodules .....	18
2. Ecrasement des nodules et ensemencement .....	18
3. Culture sur le milieu YMA + RC .....	18
4. Repiquage en milieu liquide YMB .....	19
5. Caractérisation des isolats .....	20
6.1. Vitesse de croissance .....	20
6.2. Coloration de Gram .....	20
6.3. Test GPA + BCP .....	20
6.4. Test du 3-cétolactose .....	21
6.5. Caractéristion biochimique sur la Galerie API® 20NE .....	21
6.6. Conservation des souches bactériennes .....	22

## Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion.....	23
1. Caractères morphologiques et culturaux .....	23
1.1. Croissance sur le milieu YMA+RC .....	23
1.2. Croissances sur milieu liquide YMB .....	24
1.3. Aspect microscopique .....	24
1.4. Croissance sur milieu GPA+BCP .....	25

1.5. Croissance sur le milieu 3-cétolactose .....	26
1.6. Caractéristiques biochimiques sur la galerie API 20 NE .....	28
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>31</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	
<b>Annexes</b> .....	



# ***Introduction générale***

## INTRODUCTION GENERALE

Les légumineuses sont des plantes herbacées considérées comme un support de recherche fondamentale et un matériel pour l'amélioration des plantes cultivées en raison de leurs capacités de s'associer avec des bactéries du genre *Rhizobium* après un dialogue moléculaire réussi. Cette symbiose leur confère une disponibilité directe de l'azote atmosphérique qui est réduit dans les nodosités par la nitrogénase de ces *Rhizobium*.

La fixation potentielle de l'azote par les *Rhizobium* est limitée par des contraintes environnementales dont l'impact est parfois considérable de sorte que la fixation de l'azote réelle peut être beaucoup plus faible que la fixation potentielle. Ces contraintes sont de nature physique, chimique et biologique. Les facteurs limitants agissent à différents niveaux : ils peuvent affecter le microorganisme à l'état libre, le processus d'infection et le développement du nodule et le fonctionnement de la symbiose lorsque cette dernière a été établie. En outre, la plante joue un rôle dominant par rapport à la bactérie, de sorte que tout facteur affectant l'état physiologique de la plante retentit directement sur l'activité fixatrice de l'azote de la bactérie symbiotique (**Brockwell et al., 1995**).

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

Une des bactéries symbiotiques les plus étudiées est la bactérie *Sinorhizobium meliloti* associée à la légumineuse *Medicago truncatula*, qui est la légumineuse modèle proposée par la communauté scientifique pour étudier la tolérance des plantes aux stress abiotiques (**Young et Udvardi, 2009**).

En Algérie, dans la région de l'Est à un climat méditerranéen on trouve une grande diversité de légumineuses qui occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien.

Malgré l'importance de cette symbiose *rhizobiums*, la diversité des bactéries associées à l'espèce cultivée du genre *Medicago* reste peu étudiée. Ce travail repose sur un objectif d'isolement et une caractérisation morphologique et biochimique de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin Algérien.



***Chapitre I :***  
***Revue bibliographique***

## 1. L'azote

### 1.1. Généralités

L'azote est l'élément nutritif de la plante le plus important après le carbone. C'est un constituant essentiel des protéines, acide nucléiques, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes, Il peut représenter jusqu'à 7% de la matière sèche et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif.

La plupart des plantes puisent l'essentiel de leur azote dans le sol, soit sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) ou d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu, mais l'approvisionnement en azote du sol est limité si bien que vis-à-vis de l'azote disponible, les plantes entrent en compétition avec toute une série de microorganismes. Il en résulte que l'azote est souvent un facteur limitant dans les écosystèmes naturels ou cultivés.

La plus grande partie de l'atmosphère, 80% en volume, est constitué d'azote ( $\text{N}_2$ , ou diazote), un gaz incolore et inodore.

Cependant, malgré son abondance, les plantes supérieures sont incapables de convertir le diazote en une forme biologiquement utilisable, les deux atomes du diazote sont reliés par une liaison exceptionnellement stable  $\text{N} \equiv \text{N}$  et les plantes ne possèdent pas l'enzyme capable de rompre cette liaison.

Seules certaines espèces procaryotes sont capables d'effectuer cette réaction importante. Cette situation pose aux plantes un problème particulier concernant l'absorption et l'assimilation de l'azote ; les plantes dépendant des organismes procaryotes pour convertir le diazote atmosphérique en une forme instable qu'elles puissent utiliser (Hopkins, 2003).

### 1.2. Le cycle de l'azote

Comme les autres éléments essentiels de la chimie du vivant, l'azote est réparti généralement en trois ensembles principaux : l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol et (l'eau qui lui est associée). (Fig.1)

L'azote du sol pénétré dans la biomasse surtout sous la forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) qui est absorbé par les plantes et les micro-organismes. Une fois assimilé, l'azote nitrique est converti en azote organique sous forme d'acide aminées, et d'autres composés azotés qui constitueront les protéines ainsi que d'autres macromolécules. L'azote continue son



chemin dans la chaîne alimentaire, lorsque les animaux mangent les plantes. Puis l'azote retourne au sol sous la forme de déchets animaux, ou lors de la mort de la décomposition des différents organismes (**Hopkins, 2003**).

### **1.2.1. Ammonification, nitrification et dénitrification**

Au cours de la décomposition, l'azote organique est transformé en ammoniac par une série de microorganismes. Ce processus est connu sous le terme d'ammonification (**Fig.1**). Une partie de l'ammoniac peut être volatilisée et retourne dans l'atmosphère, mais la plus grande partie est recyclée en nitrate par des bactéries de sol.

La première étape de la formation de nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*, le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter*. Ces bactéries sont dites nitrifiantes et le résultat de leur activité est la nitrification.

Les bactéries nitrifiantes sont chimioautotrophes ; ce qui signifie que l'énergie libérée par l'oxydation des matières inorganiques telle que l'ammonium ou le nitrite est utilisée pour convertir le dioxyde de carbone en carbone organique.

En prélevant l'azote dans le sol, les plantes entrent en compétition avec des bactéries dites dénitrifiantes (ex : *Thiobacillusdenitrificans*). Lors de cette réaction de dénitrification, ces bactéries réduisent le nitrate en diazote, qui retourne à l'atmosphère par dénitrification représenteraient de 93 à 190 millions de tonnes par an (**Hopkins, 2003**).

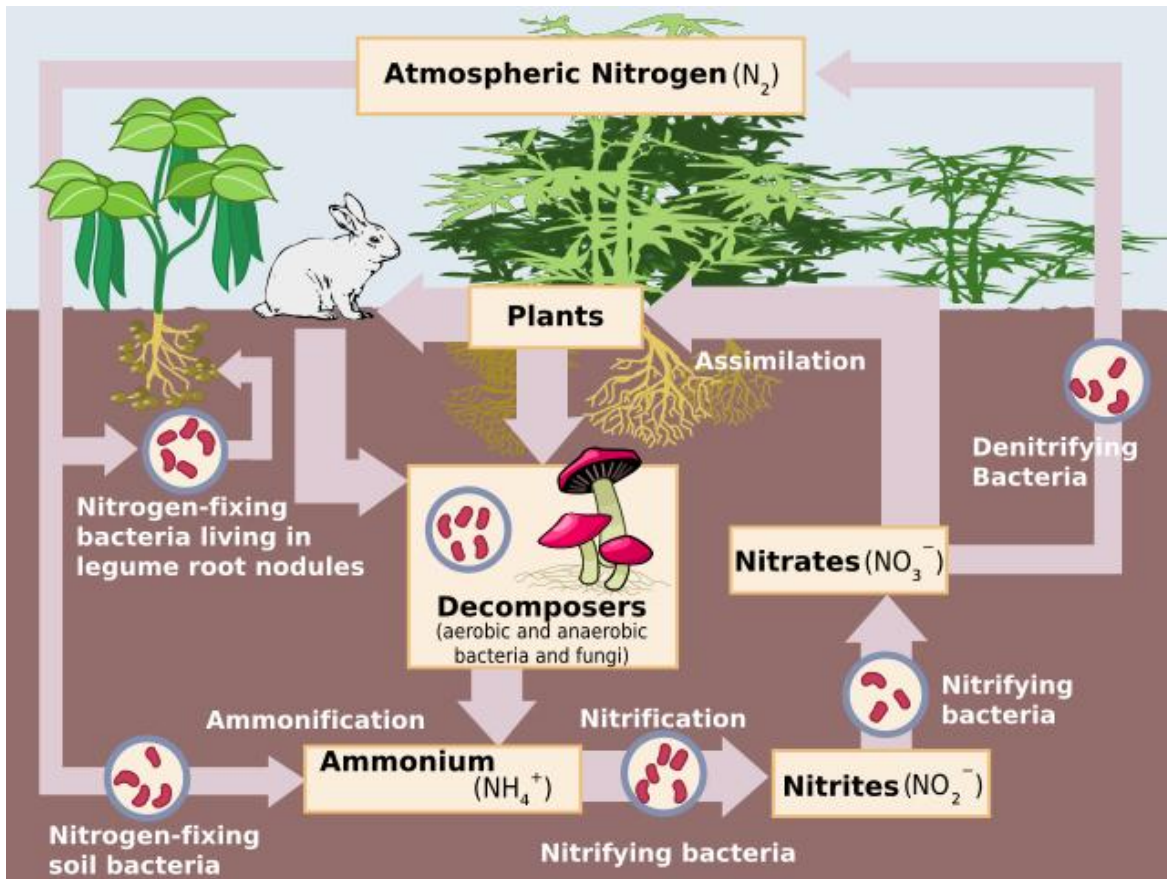
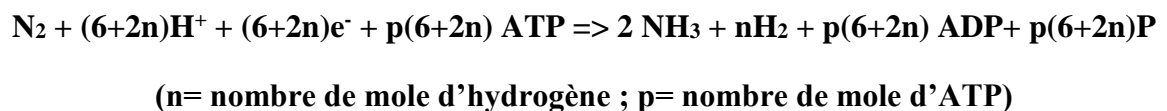


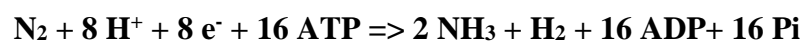
Figure.1 : le cycle de l'azote (B. PERET, 2007).

### 1.2.2. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase. La réaction catalysée est la suivante :



Le complexe nitrogénase peut également réduire les protons en dihydrogène. La quantité d'ATP nécessaire étant variable suivant les conditions, La stœchiométrie exacte de la réaction reste encore aujourd'hui inconnue. Dans le modèle standard, on considère cependant qu'une mole de dihydrogène est nécessaire pour réduire une mole de diazote et que ceci nécessite l'hydrolyse de 2 moles d'ATP (p=2 et n=1). L'équation globale typique de la fixation d'azote est dans ces conditions :

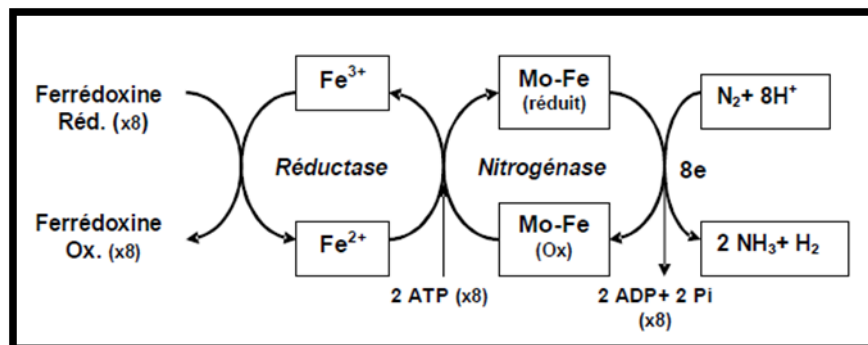


Cette réaction est catalysée par une métallo-enzyme : La nitrogénase synthétisée par tous les organismes fixateurs d'azote. Il s'agit d'un complexe associant une ferroprotéine (protéine-Fe) et une ferromolybdoprotéine (protéine-FeMo). Les gènes qui codent ces deux protéines et les autres protéines nécessaires à la réaction ou à sa régulation sont groupés dans un même opéron appelé *nif* (pour Nitrogène Fixation).

La protéine FeMo est un tétramère de 230 kDa codé par les gènes *nif D* et *nifK* ; elle contient le site réducteur du substrat. La protéine Fe est un homodimère de 64 kDa codé par le gène *nifH*, c'est le composant donneur d'électrons, il contient le site de liaison de l'ATP (Halbleib et Ludden, 2000).

Le mécanisme réactionnel (Fig.2), basé sur des études réalisées sur *Clostridium*, *Klebsiella* et *Azotobacter* fait intervenir des transferts d'électrons entre la protéine Fe et la protéine FeMo. Le cycle commence avec la liaison d'une molécule d'ATP à la protéine Fe réduite, ce qui provoque un changement de conformation et permet le transfert d'un électron de la protéine-Fe à la protéine-FeMo. L'hydrolyse d'un ATP est couplée à ce transfert. Le complexe se dissocie ensuite, la protéine Fe est alors réduite par un donneur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine) et l'ADP est échangé contre un ATP. Ce cycle est répété jusqu'à ce que suffisamment d'électrons soient transmis à la protéine FeMo ce qui lui permet, par l'intermédiaire du molybdène de les transférer au diazote qui est transformé en ammoniac (Halbleib et Ludden, 2000).

La fixation de l'azote étant un processus très coûteux en énergie, les diazotrophes pratiquent une régulation stricte de son activité. La transcription des gènes *nif* est réprimée par l'ammonium et par l'oxygène rendant la fixation impossible en inactivant la nitrogénase (Oldroyd et Downie, 2008).



**Figure. 2** : Mécanisme de réduction par la nitrogénase de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) en ammoniac (NH<sub>4</sub>) (Halbleib et Ludden, 2000).

#### 1.2.2.1. Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aéro-anaérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*). (Kennedy *et al.* 1997).

Ces associations vont de la simple multiplication bactérienne à la surface de la racine à la colonisation des espaces intercellulaires, caractéristiques des bactéries endophytes. (Dobereiner *et al.*, 1995).

De plus, les cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*), bactéries photosynthétiques autotrophes, sont associées à des fougères comme les *Azolla* ou aux *Cycas*, formant de véritables symbioses obligatoires permettant à la plante d'assimiler l'azote fixé par les bactéries qui demeurent, cependant, toujours à l'extérieur des cellules de la plante-hôte (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998).

#### 1.2.2.2. Les fixateurs symbiotiques

La réduction de l'azote étant coûteuse en énergie, les systèmes les plus efficaces sont ceux qui permettent un couplage entre la photosynthèse et la fixation biologique de l'azote.

Dans ces associations fixatrices d'azote, le microorganisme induit l'apparition de structures différenciées, appelées nodules, chez le partenaire végétal, et lui fournit une grande partie de l'azote nécessaire à sa croissance. C'est le cas des systèmes associant des plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries à Gram négatif, communément et collectivement appelées les rhizobiumes ou bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) (Moulin, 2002), et des Actinomycètes du genre *Frankia* (bactéries à Gram positif, filamenteuses et sporulantes) qui nodulent des plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones, dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica*. (Benson et Silvester, 1999).

## 2. La symbiose Légumineuses-*Rhizobiums*

Le propre des organismes vivants est d'interagir de manière permanente les uns avec les autres. Ils ont ainsi développé au cours de l'évolution des réseaux plus ou moins étendus d'inter-relation. Certaines de ces relations sont stables dans le temps et ont un impact sur le déroulement de la vie de l'un ou des deux organismes impliqués.

Toutes ces interactions sont qualifiées de symbiotiques ou de symbioses puisque ce terme grec traduit le concept de vie commune. Cependant du point de vue biologique on distinguera le parasitisme : un seul partenaire tire profit de l'interaction, et le mutualisme : les deux partenaires jouissent d'un bénéfice réciproque.

La symbiose intracellulaire qui s'établit entre diverses bactéries du sol, appelées rhizobiums, et les plantes de la famille des légumineuses aboutit à la formation de structure appelés nodosités sur les racines des plantes et parfois sur les tiges dans le cas des légumineuses aquatiques. Dans les cellules des nodosités, les bactéries se différencient en bactéroïdes, capables de réduire l'azote atmosphérique N<sub>2</sub> en une forme assimilable par la plante hôte, En contrepartie, la plante fournit aux bactéries une niche dans laquelle elles peuvent se multiplier abondamment et des composés carbonés issus de photosynthèse. Cette interaction constitue donc une symbiose, puisque les deux partenaires vivent en contact étroit (Gough, 2009).

### 2.1. Légumineuses

#### 2.1.1. Généralités

Les légumineuses (Fabaceae) constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes-dicotylédones, avec plus de 750 genres et 19000 espèces, à feuilles habituellement composées ou rarement simples, Les fleurs pentamères avec 10 étamines ou parfois plus, Fruit en gousse uniloculaire s'ouvrant en deux valves séparées et contenant de nombreuses graines, (Dommergues et al, 1999).

#### 2.1.2. Classification

Actuellement, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, les *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae* (LPWG, 2013 et Cardoso, 2013).

La nodulation des légumineuses par les rhizobia est un phénomène très fréquent si la bactérie trouve les conditions physiologiques nécessaires à la fixation de l'azote de l'air. En effet, Parmi les 20 % de légumineuses étudiées, (97%) des espèces testées sont nodulées de la sous-famille des *Papilionoideae* (se composent de 28 tribus avec environ 480 genres et 13 800 espèces ; pois, haricot, fève, lentille...), et plus de (90%) des espèces sont nodulées de la sous-famille des *Mimosoideae* (se composent de 80 genres et 3270 espèces ; robinier, glycine, acacia...) et (23%) de la sous-famille des *Caesalpinioideae* seulement capables d'être nodulées; (se composent de 171 genres et 2300 espèces ; flamboyant, barbade, ...) sont nodulées par les rhizobia (Lewis *et al.*, 2005).

### 2.1.3. Importance

Les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique. Elles constituent par ailleurs une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot...) que pour l'animal (trèfle, luzerne...), (**Tab.1**). Si les légumineuses ont été utilisées empiriquement depuis l'Antiquité pour améliorer ou entretenir la fertilité des sols, il n'y a qu'une quinzaine d'année que le mécanisme moléculaire régissant la mise en place de cette symbiose a été découvert. (Lerouge *et al.* 1990).

**Tableau 1** : Estimation des quantités d'azote fixé par différentes légumineuses cultivées (valeurs extrêmes entre parenthèses) (Vilain, 1997 ; Soltner, 2005).

Espèces	N fixe Kg/ ha
<b>Luzerne</b>	<b>200 (56-463)</b>
Trèfle	183 (45-673)
Lupin	176 (145-208)
Fève	210 (45-552)
Pois	65 (52-77)
Lentille	105 (88-114)
Soja	75 (1-168)

### 3. La symbiose *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium melliloti*

#### 3.1. Le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* ou l'herbe de Médic appartient à la famille des *Fabaceae* sous-famille de *Papilionoideae*, il comporte 21 espèces herbacées pérennes, 63 espèces annuelles variables, et sont classées en 4 sous-genres par (Lesins et Lesins, 1979) sur la base de la morphologie des gousses et des graines : *Lupularia*, *Orbicularia*, *Spirocarpos* et *Medicago* (Fig.3).

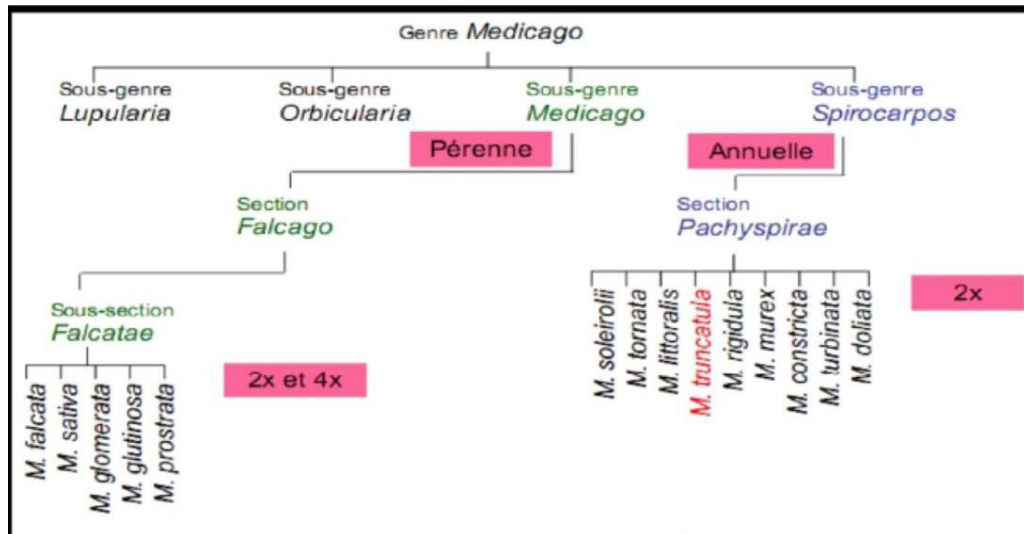


Figure 3 : Taxonomie du genre *Medicago* (Small et Jomphe, 1989).

#### 3.1.1. *Medicago truncatula*

Dans l'objectif d'avoir un système génétique simple pour les légumineuses, *Medicago truncatula* a été choisie comme espèce modèle par de nombreux laboratoires. Au contraire de la majorité des légumineuses, *M. truncatula* est bien accessible aux outils moléculaires et aux analyses génétiques. Elle est donc adaptée à l'étude des mécanismes biologiques des grandes fonctions spécifiques aux légumineuses. (Fatma et al, 2008).

##### A) Intérêt biologique

C'est une plante annuelle herbacée, ramifiée au port souvent rampant de 15 à 80 cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées. Ses petites fleurs jaunes de 5 à 8 mm donnent après autofécondation des gousses cylindriques très dures. Les graines de cette plante ont une durée de vie importante supérieure à 40 ans, et une dormance qui peut être levée facilement (Lesins et Lesins 1979). Selon ces mêmes auteurs, *M. truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois. Cette espèce possède un habitat variable. Elle

prédomine au niveau des stations sèches, des sols lourds, marneux ou argileux. Comme toutes les légumineuses sa principale caractéristique biologique est la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

Récemment, l'intérêt fut focalisé sur *M. truncatula* comme système pour examiner la grande richesse de production de métabolites secondaires par les légumineuses et la résistance aux maladies (**Gepts et al. 2005**).

### **B) Intérêt génétique**

*M. truncatula* présente plusieurs avantages qui la prédisposent aux études génétiques. C'est une plante annuelle, diploïde ( $2n=16$ ), autogame, et elle possède un génome de faible taille de 5108pb, soit environ 4x celui d'*Arabidopsis* (**Blondon et al. 1994**). C'est également une plante apte à la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* et à la régénération par embryogenèse somatique (**Thomas et al. 1992 ; Chabaud et al. 1996**). Le séquençage du génome des souches de référence de *S. meliloti* 1021 et 2011 est disponible sur le site : <http://sequence.toulouse.inra.fr/>

## **3.2. Les rhizobiums**

### **3.2.1. Généralité**

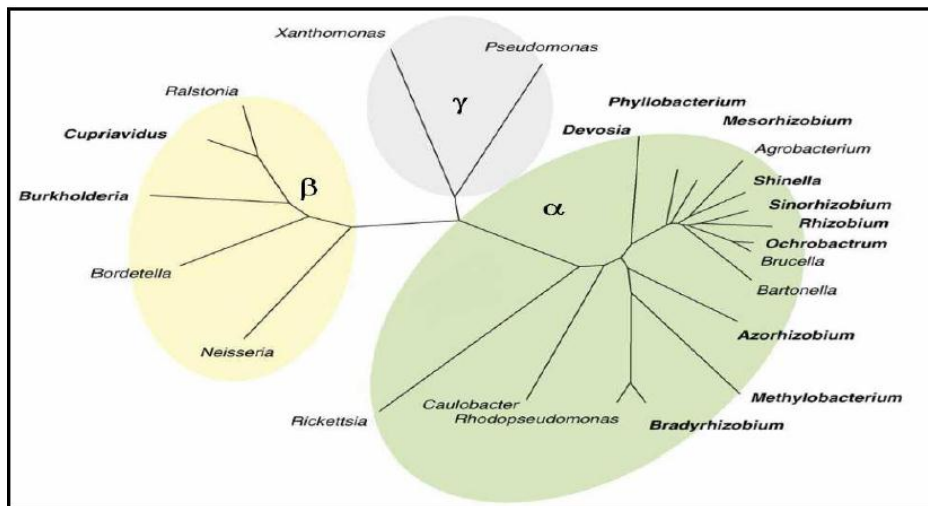
Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée « rhizobium » (du grec rhiza : racine et bios : vie). Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au XIXème siècle comme des bactéries Gram négative, aérobie ou micro-aérophile et présentes soit à l'état libre en générale ou en association avec des légumineuses, possédant une forme de bâtonnets réguliers de 0.5 à 0.9µm de largeur sur 1.2 à 3µm de longueur (**Jordan 1984**). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un seul flagelle polaire ou par 2 à 6 flagelles péritriches (**Wener 1992**).

Les rhizobiums sont des bactéries chimiogantrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, et des composés aminés, et certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances. On distingue deux genres de rhizobia par leur vitesse de croissance: des souches à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4h, et qui devait plus tard se subdiviser en plusieurs genres (*Rhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*), et le genre *Bradyrhizobium*



contenant des souches à croissance lente ils produisent une turbidité dans le milieu liquide en 3-5 jours et une vitesse de dédoublement chaque 6-8h. (Samasegaran et Hoben, 1994), leurs croissance est optimale à une température de 28°C et un pH compris entre 6 et 7 (Burton, 1985).

De nos jours, l'usage de la séquence de l'ADNr 16S reste l'outil principal dans l'étude de la phylogénie microbienne (Fig. 4).



**Figure 4** : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S, 15 genres α-protéobactéries - 05 genres β-protéobactéries et 02 genres γ-protéobactéries. Les genres engras contiennent les rhizobiums nodulants les légumineuses (Masson-Boivin et al., 2009).

Ces bactéries ont la capacité d'interagir avec les plantes de la famille des légumineuses. La symbiose entre légumineuses et *Rhizobia* est dans la plupart des cas très spécifique. En effet, une espèce de *Rhizobium* n'infecte généralement qu'un nombre limité d'espèce de légumineuses et inversement. Par exemple, *Sinorhizobium meliloti* ne peut infecter efficacement que les plantes des genres *Medicago*, *Trigonella* et *Melilotus* selon le degré de spécificité (Tab. 2).

### 3.2.2. Genre *Sinorhizobium*

Le nom de genre *Sinorhizobium* est conservé jusqu'ici pour ranger une espèce unique : *Sinorhizobium morlense* (Wang et al., 2002) qui semble relativement distante de toutes les autres ex-espèces de *Sinorhizobium* requalifiées en *Ensifer*.

**Tableau 2** : Spécificité de la symbiose Sinorhizobium / légumineuse (Sahgal et Johri 2003).

<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arbaris</i>	<i>Acacia senegal</i>
		<i>Prosopis chilensis</i>
	<i>S. fredii</i>	<i>G. max</i>
	<i>S.kostiense</i>	<i>A. semgal</i>
		<i>P. chilensis</i>
	<i>S.medicae</i>	<i>Medicago spp</i>
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>S. terangae</i>	<i>Acacia, Sesbania</i>
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>G. max</i>

#### 4. Processus de nodulation

Le processus d'une symbiose fixatrice d'azote se traduit par la capacité des rhizobia à induire la formation de nodosités au niveau des racines ou des tiges d'une plante hôte particulière.

##### 4.1. L'infection et la formation des nodules

Le site de fixation symbiotique est le nodule, le seul organe localisé sur la racine qui fonctionne pour la survie des bactéries et l'activité de la Nitrogénase. La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiont et la plante hôte (Foucher et Kondorosi, 2000).

L'interaction s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires rhizobia et des jeunes poils absorbants cette l'étape de pré-infection prend quelques heures à 24h postinoculation (Fig.05).

Dans un premier temps, les bactéries reconnaissent des flavonoïdes qui sont sécrétées par la plante hôte. Ces molécules induisent la production de facteurs NOD par les rhizobia (Oldroyd 2001).

Les facteurs NOD sont des lipo-chitoooligosaccharides (LCO) émis par la bactérie, à l'origine de la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques (Dénarié et al., 1996).

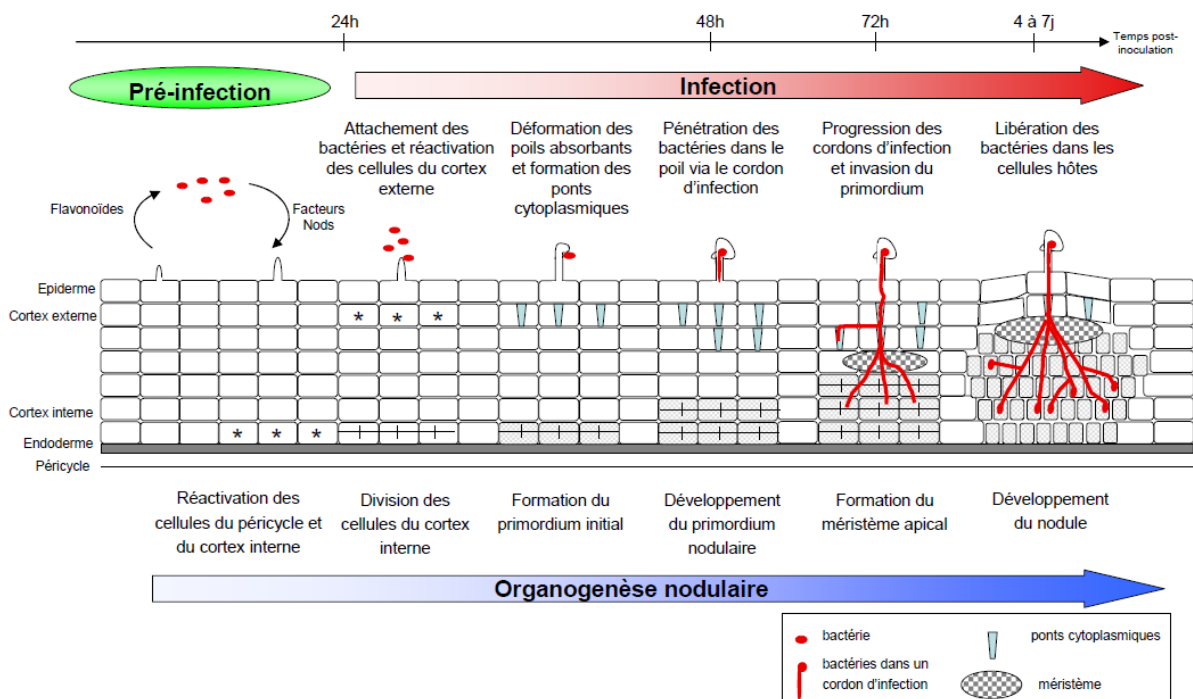
Les facteurs NOD agissent essentiellement sur deux types de cellules au niveau de la racine : Les cellules épidermiques et corticales. Au niveau des cellules épidermiques, les

facteurs NOD induisent une dépolarisation de la membrane plasmique, une oscillation du flux de  $Ca^{2+}$ , une induction de l'expression de gènes spécifiques 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).

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

Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire. Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréplication. Elles sont alors envahies par des rhizobia qui sont relâchés des cordons d'infection (Cermola et al., 2000 ; Brewin 2004). Ensuite, la pénétration de la bactérie est faite par endocytose.

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



**Figure 5** : Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé (*M. truncatula*) (Patriarca *et al.*, 2004).

#### 4.2. La régulation du nombre des nodules

La nodulation est le résultat d'un dialogue utilisant des signaux moléculaires entre le microsymbiont et la plante hôte. La symbiose est contrôlée par un processus d'autorégulation qui commande le nombre de nodules et la fixation de l'azote par une signalisation à distance (Caetano-Anolles *et al.*, 1991).

Après inoculation, les nodules sont formés dans les régions spécifiques de la racine.

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

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

#### 4.3. Spécificité symbiotique

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

### 5. Effets de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuses

#### 5.1. Effet sur le processus d'infection et le développement des nodules

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte et en affectant certains de ses processus physiologiques ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules (Zahran, 1999 ; Cesar *et al.*, 2011).

En général, les premières étapes de la nodulation sont plus sensibles au stress salin que plus tard (Cordovilla *et al.*, 1999 ; Cesar *et al.*, 2011).

## 5.2. Effet sur l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire

La salinité inhibe l'activité de la nitrogénase (Aydi et al., 2008 ; Faghire et al., 2011) et la respiration nodulaire (Serraj et al., 1994) qui provoque, par la suite, une diminution des teneurs en azote total dans la plante (Salehi et al., 2008 ; Faghire et al., 2011).

La réduction de l'activité fixatrice de N<sub>2</sub> par le stress salin est généralement due à la réduction de la respiration nodulaire (Drevon et al., 1994 ; Bargaz et al., 2011a et b). Cette réduction est due à une limitation de l'O<sub>2</sub> ou du substrat N<sub>2</sub> (Soussi et al., 2001 ; Serrat, 2002) ou une diminution de la production de protéines cytosoliques, surtout la légghémoglobine, par les nodules (Delgado et al., 1994 ; López et al., 2008).

## 6. Intérêt des bactéries nodulants les légumineuses en biotechnologie

L'intérêt majeur des bactéries nodulants chez la famille des légumineuses réside dans leur capacité à fixer l'azote atmosphérique dans le cadre d'une relation symbiotique avec les espèces végétales de cette famille dont plusieurs plantes d'intérêt économique font partie.

Du fait que cette relation soit d'une grande spécificité, la sélection et l'étude de ces bactéries pour des fins agronomiques et d'une importance majeure.

Aujourd'hui les biotechnologistes sont travaillent sur l'inoculum qui consiste à introduire les souches de *Rhizobium* dans l'écosystème plante-sol ; un inoculum étant une formulation des souches en porteur solide ou liquide et sont peuvent agir de plusieurs manières : Action directe, action indirecte, protection.

Un bon inoculum doit être préparé avec des souches rhizobiennes d'une grande efficacité en conditions de champ. Elles doivent avoir une grande spécificité afin d'être compétitives pour la formation des nodules et être aptes à promouvoir les performances de l'hôte.

Les souches rhizobiennes doivent survivre dans l'inoculum et maintenir ces propriétés durant la période de stockage. Elles doivent être tolérantes aux facteurs de stress tels : l'acidité la dessiccation température élevée et des pesticides chimiques (Baraibar 2000).



***Chapitre II :***  
***Matériel et méthodes***

## Matériel et Méthodes :

### I. Matériel biologique :

Le matériel biologique sur lequel nous avons travaillé est constitué de nodules récoltés à partir des racines de la plante *Medicago truncatula* poussant à l'état spontané dans la région de Collo – bord de mer- de wilaya Skikda située à environ 100Km de Constantine (latitude 36°59'57.1"N et longitude 6°43'03.0"E et une l'altitude de 20m) (Fig. 6).



**Figure 6 :** Localisation géographique des zones de prélèvement -Collo- (Google earth 2018)

### II. Méthodes

#### 1. Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules est effectuée à partir de trois plantes différents durant le mois d'Avril, où la plante à l'état de floraison. A cette période de l'année, les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines.

Les 10 nodules récoltés sont des petites tailles en différent forme avec une couleur rose à l'intérieur indiquant par conséquent la présence de la lèghémoglobine et la fixation de l'azote (Fig. 7).

Les nodules sont référencés par (S1, S2, .... , S10) pour étudies les différents critères de chaque un.

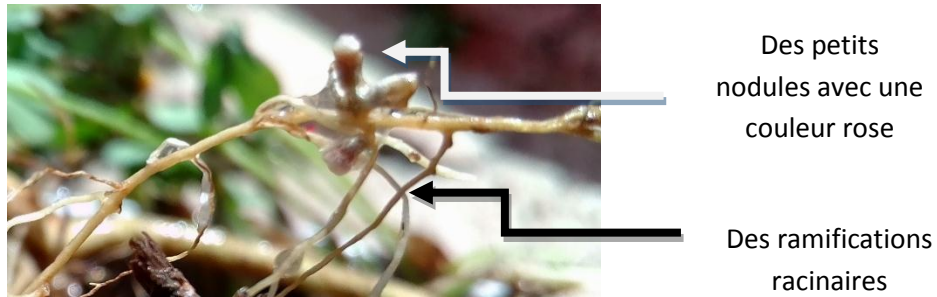


Figure 7 : Prélèvement des nodules

## 2. Stérilisation des nodules

La technique classique d'isolement des souches de *Rhizobium* décrite par (Cleyet-Marel, 1989) a été adoptée. Les nodules stériles individuellement dans l'éthanol à 95° durant 30 secondes, ensuite transférés dans l'eau oxygénée 100V pendant 25 minutes pour éliminer le plus de bactéries possibles de la rhizosphère. Ensuite sot rincés 10 fois à l'eau distillée stérile. Dans une plaque de microtitration stérile (Fig. 8).



Figure 8 : Plaque de microtitration utilisée pour la stérilisation et écrasement des nodules.

## 3. Ecrasement des nodules et ensemencement

Chaque nodosité il est broyée dans un seul cuve avec des gouttes d'eau stérile, l'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...).

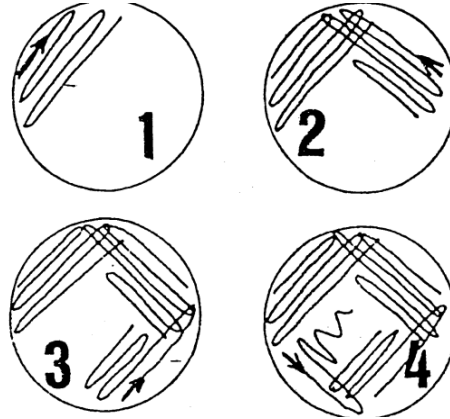
## 4. Culture sur le milieu YMA + RC

A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de chaque nodule écrasé est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeat-Mannitol-Agar (YMA, Vincent, J.M., 1970) additionné de rouge Congo (0.025%) (Annexes 1).



L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (**Fig. 9**) de manière d'avoir des colonies isolées et donc facile à caractériser.

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



**Figure 9** : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

### 5. Repiquage en milieu liquide

La purification des colonies a été réalisée par des repiquages successifs des colonies blanches sur des tubes à visse contenant 5ml de milieu YMB cette méthode consiste de dilution la concentration bactérienne, puis les placer dans un incubateur agitateur de 220 tour/min à 28°C pendant 3 à 4 jours (**Fig. 10**).



**Figure 10** : Repiquage en milieu liquide sous la hotte.

## 6. Caractérisation des isolats

### 6.1. Vitesse de croissance

La vitesse de croissance a été estimée selon la méthode proposée par (Somasegaran et Hoben, 1994), qui considère que les souches à croissance rapide engendrent une culture bactérienne après 48h d'incubation. Les souches à croissance lente nécessitent 3 à 7 jours.

### 6.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram a été effectuée à partir des suspensions bactériennes incubées pendant 72h à 28°C sur milieu YMB, selon la méthode classique (Annexes II), C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer les bactéries dites (Gram<sup>+</sup>) et des bactéries dites (Gram<sup>-</sup>).

### 6.3. Test de croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA) + pourpre de bromocrésol (BCP) (g/l).

Le Glucose Peptone Agar (GPA) est un milieu nutritif très riche qui favorise le développement de grand nombre des bactéries comme les entérobactéries et les *Agrobacterium*.

- ✓ Additionner 5ml de la solution de pourpre de bromocrésol (BCP) (Annexes I) à un 455ml du milieu (GPA) pour la mise en évidence des souches bactériennes contaminants. Les souches de *Rhizobium* n'acidifient pas le milieu.
- ✓ Ensemencer les isolats par anse de platine sur des boîtes contenant le GPA+BCP et incubé à 28°C pendant 48 h.

#### 6.4. Test du 3-cétolactose : Teste distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Ce teste est basé sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides (**Bernaerts et De Ley, 1963**) seules les souches d'*Agrobacterium* produisent l'enzyme, une 3-cétoglucosidase.

Le teste est réalisé suite à deux cultures successifs sur deux milieux différents **A** et **B**.

- La première culture est réalisée sur le milieu **A** (**Annexes I**) pendant 72h.
- Après 72h on prélève une colonie et on ensemence le deuxième milieu **B** (**Annexes I**).
- Après 72h d'incubation à 28°C, les inonder avec le réactif de Benedict à température ambiante (**Annexes 1**).

Les souches appartenant au genre *Agrobacterium* produisent l'enzyme 3-cétolactose qui se manifestent par la formation d'un halo jaune de Cu<sub>2</sub>O de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict.

#### 6.5. Caractérisation biochimique sur galerie API® 20NE

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

A partir d'une colonie bactérienne, une suspension de turbidité moyenne est réalisée dans 5ml d'eau physiologique stérile (0.85% NaCl). Cette suspension est utilisée pour ensemencer les cupules de la galerie.

L'ensemencement des huit premières cupules est réalisé directement à partir de la suspension. Les douze cupules restantes sont ensemencées par une préparation à base d'un mélange de suspension bactérienne et le réactif galerie AUX Médium (*BioMérieux, 20050*).

Après 24 heures d'incubation à 36 °C, la lecture des résultats se fait directement sur la galerie par observation du changement de la couleur dans les huit premiers cupules et l'apparition d'un trouble dans les autres. Seuls les tests N03- et TRP sont révélés par ajout de réactifs spécifiques fournis par le fabricant.

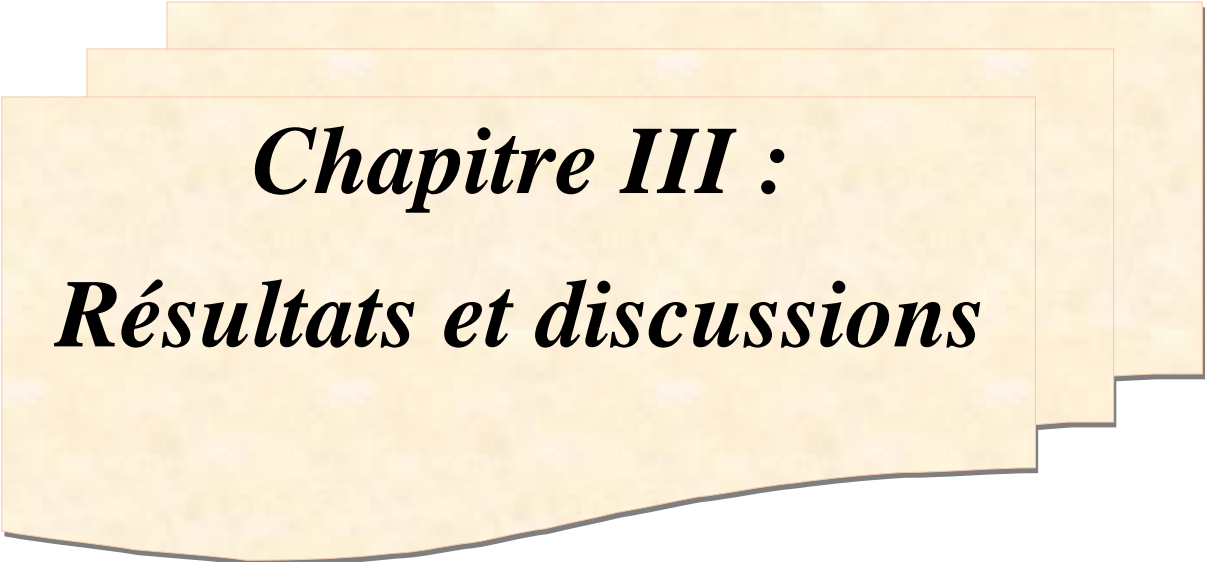


Figure 11 : mode d'emploi sur les galeries

#### 6.6. Conservation des souches bactériennes

La préparation des échantillons à conserver a été réalisée en mélangeant 1 ml de suspension bactérienne avec 1 ml de glycérol à 50%.

Les échantillons préparés ont été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .



***Chapitre III :***  
***Résultats et discussions***

## Résultats et discussion

### 1- Caractères morphologiques et cultureux

#### 1-1- Croissance sur le milieu YMA+RC (0.025%)

L'ensemencement du broyat nodulaire sur le milieu YMA+RC a donné des colonies qui absorbent peu le rouge Congo après trois jours de croissance, elles sont sous forme ronde de couleur rose claire visqueuses (**Fig. 12**).

Les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiacées* ont la particularité de produire des acides en présence de mannitol comme une seule source de carbone dans le milieu (**Samasegaran et Hoben, 1994**). Cette acidification elle est mis en évidence par l'utilisation d'un indicateur de pH qui est dans notre cas le Rouge Congo.

Ainsi, les résultats obtenus montrent que les colonies obtenues à partir des échantillons utilisés appartiennent à des bactéries de la famille des *Rhizobiacées*.



**Figure 12** : Croissance sur milieu YMA+ RC après 72h d'incubation.

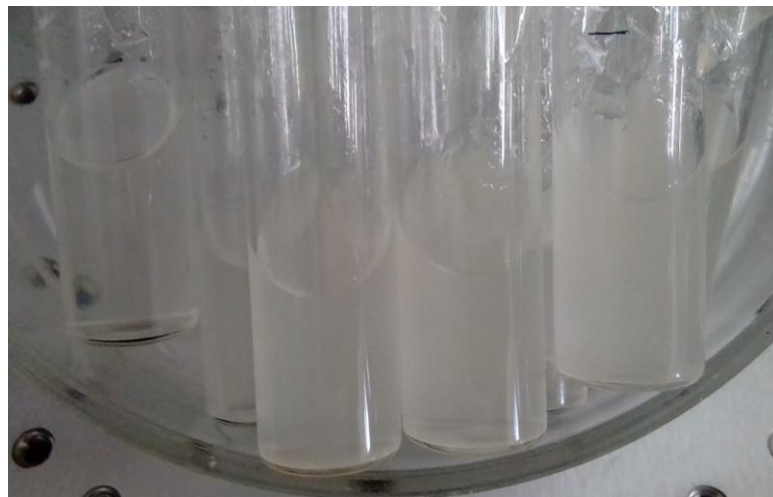
### 1-2- Croissances sur milieu liquide

La culture de bactéries isolées sur milieu liquide YMB et l'observation de la turbidité montre que ces bactéries ont des vitesses de croissance différentes.

Ainsi, on a pu observer un trouble dans les tubes S1, S3, S7, S8, S9 après seulement 48h de croissance. L'apparition d'une turbidité chez les autres tubes (S2, S4, S5, S6, S10) n'a pas été observée qu'à partir de 72h d'incubation (**Fig. 13**).

Selon **Somasegaran et Hoben, (1994)**, les souches de *Rhizobia* peuvent être classées en deux catégories suivant leur vitesse de croissance :

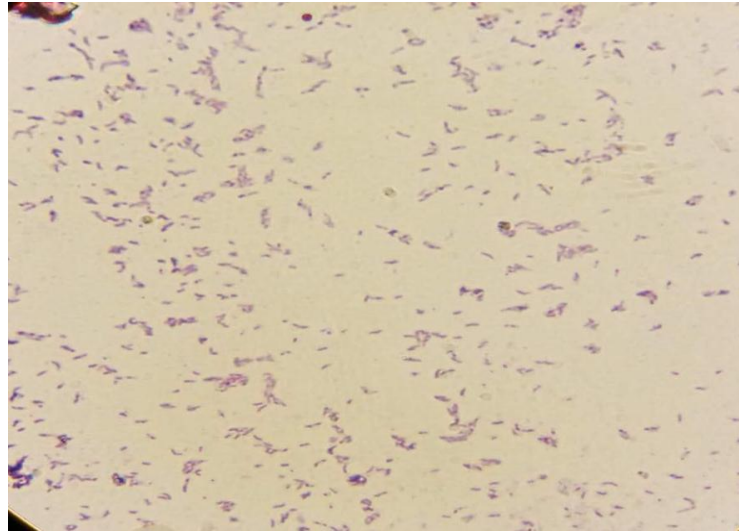
Les souches qui donnent un trouble sur milieu liquide en 48h et qui sont considérées comme souches à croissance rapide et les souches qui donnent un trouble sur milieu liquide après 72h sont considérées comme souches à croissance lente.



**Figure 13** : Culture bactérienne sur milieu liquide.

### 1-3- Aspect microscopique

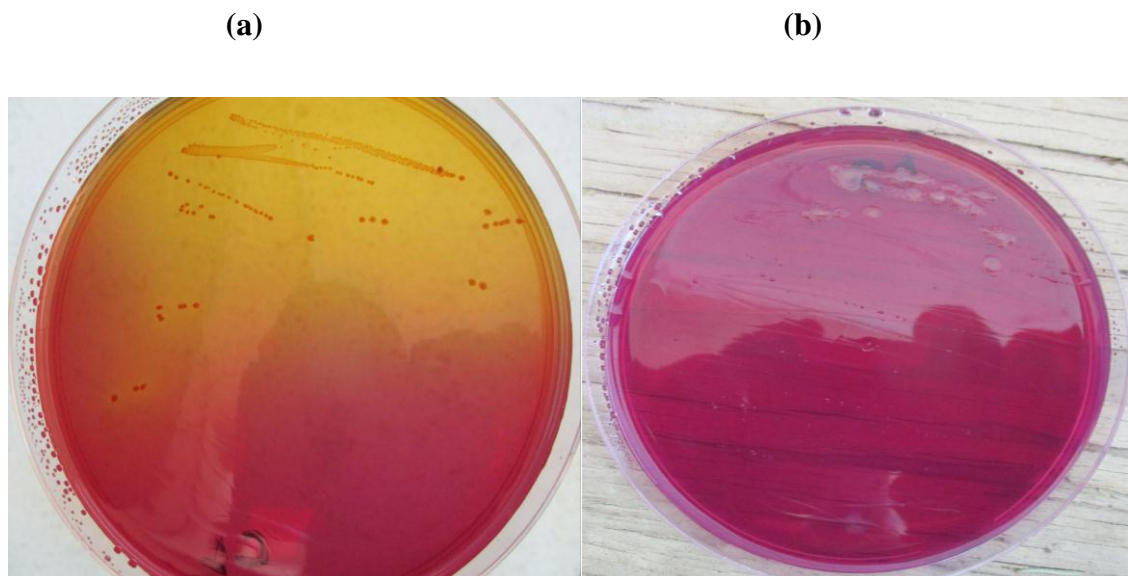
L'observation au microscope optique des frottis révélés à la coloration de Gram (**Annexes 2**), nous montre que pour tous les isolats testés, les bactéries ont une forme de bâtonnet court et de type Gram négatif (**Fig. 14**).



**Figure 14** : Observation microscopique des bactéries isolées : (G×100).

#### 1-4- Croissance sur milieu GPA+BCP

La culture sur milieu GPA+BCP des bactéries isolées a permis le développement de colonies accompagné d'une acidification du milieu plus ou moins marquée chez les isolats S1, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, et seule la souche S2 présente une alcalinisation du milieu (**Fig. 15**).



**Figure 15** : Test sur milieu GPA+BCP

(a) Acidification sur milieu GPA+ BCP

(b) Alcalinisation sur milieu GPA+BCP



La fermentation du glucose est un critère de différenciation utilisé pour la discrimination entre les espèces bactériennes qui n'appartiennent pas à la famille des entérobactéries. Cette fermentation se manifeste par la production d'acide entraînant la modification de la couleur de l'indicateur de pH utilisé qui est dans notre cas le pourpre de bromocrésol.

Selon **Beck et al. (1993)**, Ce milieu est généralement utilisé comme milieu de purification pour les *Rhizobia*, qui sont caractéristiques par aucun vraiment changement du pH, contrairement au contaminant qui change la couleur du milieu du violacé en jaune.

#### 1-5- Test du 3-cetolactose : Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

La culture des bactéries sur milieu **A** et **B** de 3-cetolactose a permis la croissance des colonies blanchâtre rond visqueuse après une incubation de 72h.

Ainsi, on a observé que toutes les souches sont restées blanchâtre après l'addition de réactif de Benedict ; aucun halo n'est formé autour des colonies. De ce fait les isolats n'oxydent pas le C<sub>3</sub> du glycosyl du Lactose et ne produisent pas de 3-cetoglucosidase. Ce test montre que nos résultats elle est négatif (**Fig. 16**).



**Figure 16** : Test du 3-cetolactose

(A) : Culture bactérienne sur milieu **A** de 3-cetolactose.

(B) : Culture bactérienne sur milieu **B** de 3-cetolactose + réactif de Benedict.

La distinction entre les *Rhizobia* et les *Agrobacterium* qui forment la fraction de contaminant les plus souvent rencontré se fait en testant leur capacité à produire la cétolactase qui convertit le lactose en cétolactose qui inter-réagit avec le réactif de Benedict par la formation d'un halo jaune. (**Harpreet et al, 2012**). Les colonies restent blanchâtres ainsi nous confirmons que les bactéries appartenant au genre *rhizobium*.

**1-6- Caractérisation biochimiques sur galerie API 20 NE**

Après 24h d'incubation à 36°C les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après (Tab. 4) :

**Tableau 4 : Résultats des tests biochimiques effectués sur la galerie API 20 NE**

		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
		galerie API 20NE									
Tests conventionnels	NO3 potassium nitrate	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	TRP L-tryptophane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	GLU + D-glucose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ADH L-arginine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	URE Urée	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	ESC esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	GEL Gélatine	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	PNPG BDgalactopyranoside	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Tests d'assimilation	GLU D-glucose	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	ARA L-arabinose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	MNE D-mannose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	MAN D-mannitol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	NAG N-acetyl-glucosamine	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	MAL D-maltose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
	GNT potassium gluconate	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	CAP capric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ADI adipic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MLT malic acid	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
	CIT trisodium citrate	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
PAC phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ : Test positif.

GLU+ : Glucose fermenté

- : Test négatif

➤ **Les tests conventionnels : (Tableau 04) :**

- **Réduction des nitrates (NO<sub>3</sub>) :**

Les résultats obtenus montrent que seules les souches S1, S2 et S4 sont capables de réduire les nitrates en nitrites alors que le reste des souches testées présentent une réaction négative.

- **L'utilisation du tryptophane (TRP) :**

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches étudiées produisent de l'indole à partir du tryptophane.

- **La fermentation du glucose (GLU+) :**

Les résultats obtenus montrent que seule la souche S1 est capable de fermenter le glucose.

- **L'hydrolyse de l'arginine (ADH) :**

Les résultats obtenus montrent que la souche S4 est la seule qui est capable d'hydrolyser la L-arginine.

- **L'hydrolyse de l'urée (URE) :**

Les résultats obtenus montrent que les souches S3, S4, S6, S7, S9 et S10 possèdent une uréase alors que les autres en sont dépourvu.

- **L'hydrolyse de l'esculine (ESC) :**

Mise à part la souche S10, toutes les autres souches sont capables d'hydrolyser l'esculine.

- **L'hydrolyse de la gélatine (GEL) :**

Les résultats obtenus montrent que seules les souches S1, S2 et S3 sont capables d'hydrolyser la gélatine.

- **Activité  $\beta$ -D galactopyranoside (PNPG) :** Les résultats obtenus montrent que seules les souches S2, S4, S5 et S7 possèdent une  $\beta$ -galactosidase.

- **Les tests d'assimilation :**

Les tests d'assimilation montrent que parmi les différents substrats utilisés, trois acides n'ont été assimilés par aucune des souches étudiées. Ces substrats sont : l'acide caprique, l'acide adipique et l'acide phenyl acetique. Pour les neuf substrats restants, on constate que seule la souche S4 est capable de les assimiler tous, la

souche S3 n'assimile pas le citrate trisodium alors que les souches S1 et S2 quant à elles n'assimilent pas l'acide malique et le citrate trisodium.

La souche S5 n'assimile aucun substrat alors que la souche S10 n'assimile que le maltose.

Les souches S6, S7, S8 et S9 forment un groupe hétérogène par rapport au pouvoir d'assimilation de ces différents substrats.

*Niste et ses collaborateurs (2015)*, ont utilisé le système d'identification biochimique API 20NE sur une collection de 20 isolats nodulaire à partir de *Trifolium pratense* et *Medicago sativa*.

Ils ont constaté une diversité dans l'utilisation des carbohydrates chez les *Rhizobia* et rapporte que ce résultat confirme d'autres travaux antérieurs. Cette diversité renseigne sur une variabilité de l'équipement enzymatique.



# ***Conclusion générale***

## CONCLUSION

Le présent travail a porté sur l'isolement et la caractérisation de bactéries nodulantes de l'espèce *Medicago truncatula* poussant à l'état spontané en milieu salin (région de la région de Collo – wilaya Skikda) tout en suivant la démarche décrite par **Vincent (1970)** et **Somasegaran et Hoben (1994)**, relative à l'identification des bactéries appartenant aux genres *Rhizobia*.

Au total, 10 isolats nodulaires ont été étudiés, et les résultats obtenus coïncident avec les caractéristiques des espèces bactériennes appartenant à la famille des Rhizobiaceae décrites par ces chercheurs à savoir de la morphologie et la biochimie relative au métabolisme des sucres testés sur les milieux YMA + RC, GPA +BCP et le test du 3-cetolactose.

L'étude biochimique sur les galeries *API 20NE* a montré une grande diversité des caractères traduisant une variabilité de l'équipement enzymatique et du potentiel d'assimilation des substrats organiques.

Les résultats obtenus durant cette étude peuvent être considérés comme une contribution à la collection des ressources génétiques et ouvrent la voie pour d'autres perspectives intéressantes dans le domaine de la fixation symbiotique de l'azote comme le test de nodulation et la détermination du statut taxonomique de ces bactéries par les techniques de biologie moléculaire.



# *Références*



## Références bibliographiques

---

A

**Aydi S, Sassi S, Abdely C, 2008.** Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant and Soil* 312: 59-67.

---

B

**Baraibar A., 2000.** Rhizobium inoculants formulations, field performance and inoculation procedures.

**Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C, 2011.** Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55:69-75.

**Beck D.P., Materon L.A. et Afandi, 1993.** Pratical Rhizobium-Legume Technology Manual. Syria.

**Benson, D. R et Silvester. W.B., (1999).** biology of frankia strains, actinomycete symbionts of actnorhizal plants. *Microbiological Reviews*. 57(2): 293-319.

**BERNAERTS J.E., DE LEY J. 1963.** A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 199 :406-407.

**Blondon F, Marie D, Brown S, Kondorosi A (1994)** Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* species. *Genome* 37: 264-270.

**Brewin NJ (2004)** Plant cell wall remodelling in the rhizobium legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23: 293–316.

**Brockwell J., Bottomley P.J., and Thies J.E.1995.** Manipulation of Rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant soil* .174: 143-180.

---

C

**Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991)** Plant Genetic Control of Nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345-382.

**Cardoso, D., Pennington, R.T., De Queiroz, L.P., Boatwright, J.S., Van Wyk, B.E., Wojciechowski, M.F. and Lavin, M., 2013.** Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany*, 89, pp.58-75.

**Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ, 2011.** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*. 5: 24-31.

**Chabaud M, Larssonneau C, Marmouget C, Huguet T (1996)** Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Rep.* 15 : 305-310.

**Cleyet-Marel, J.C. (1989).** Protocole de prélèvement et de conservation de nodosités récoltés sur les racines de Légumineuses. In : fichier technique de fixation symbiotique de l'azote, II RHIZ 1C. Rome : FAO.

**Cordovilla MP, Ligerio F, Lluch C, 1999.** Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO<sub>3</sub> fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant Science* 140:127-136.

---

**D**

---

**Delgado MJ, Ligerio F, Lluch C, 1994.** Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol Biochem* 26:371-376.

**Dénarié J, Debelle F, Prome JC (1996)** Rhizobium lipo-chitoooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65: 503±535.

**Dommergues. Y, Duhoux. E, Diem.H.G., (1999).** Les arbres fixateurs d'azote. Caractérisation fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Éditions espaces 34 (CRAD, FAO; IRD).

**Durand J.H. 1983.** Les sols irrigable, Etude pédologique. Ed. Département de géographie de l'université de Paris – Sorbonne, 389p.

**Drevon JJ, Deransart C, Ireki H, Payre H, Roy G et Serraj R, 1994.** La salinité abaisse la conductance des nodosités de légumineuses à la diffusion de l'oxygène, in : Drevon J.J. (Ed), Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen, INRA Editions, les colloques 77 :73-84.

---

**E**

---

**Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC (2003)** Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982–1988.

---

**F**

---

**Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C, 2011.** Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55:69-75.

**FAO, 1983.** L'irrigation localisée, calcul mise en place, exploitation control fonctionnelle.

**Fatma LAZREK - BEN FRIHA 2008 ;** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin ; En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE.

**Foucher F et Kondorosi E., (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43 :773-786.

---

**G**

---

**Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005)** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228–1235.

**Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Döbereiner J, De Ley J., (1989).** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International journal of systematic bacteriology*. 39 : 361–364.

**Gough C (2009)** *Medicago truncatula*, un modele pour l'étude des endosymbioses racinaires. *BIOFUTUR* 298 : 30-32.

---

**H**

---

**Halbleib et Ludden, 2000.** Regulation of biological nitrogen fixation. *Journal of Nutrition* 130 (5) : 1081/1084.

**Harpreed K, Poonam S, Navprabhjot K, and Gill B.S, (2002).** Phenotypic and biochemical charctezation of *Bradyrhizobium* and *Ensifer* SPP, Isolated from soybean rhizosphere. *Bioscience Discovry*. 3 (1) : 40-46.

**Hopkins W.G., (2003).** *Physiologie végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. P 99 – 120.

---

**J**

---

**Jordan DC. (1984).** Rhizobiaceae In N. R. Krieg and J. G. Holt editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. 234-242.

---

**K**

---

**Kennedy, I.R, Pereg-Gerk.L.L, Wood, C., Deaker, R, Gilchrist, K., and Katupitiya, S., (1997).** Biological nitrogen fixation in non-leguminous Field crops: Facilitating the evolution of an effective association between azospirillum and wheat. Plant and soil.194: 65-79.

**KUMAR D., 2008:** Definitional Glossary Of Agricultural Terms: I. K. International Pvt Ltd, 328 P.

---

**L**

---

**Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F. and Truchet, G., 1990.** Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature, 344(6268), p.781.

**Lesins K, Lesins I (1979)** Genus Medicago (Leguminosae). A taxonomic study., Junk, The Hague, Netherlands.

**Lewis, G.A.; Schrire, B.B.; Mackinder, B.C.; Lock, M.D, 2005.** Legumes of the World; Kew: Royal Botanic Gardens, London, UK.

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

---

**M**

---

**Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009)** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes. Trends in Microbiology 17 (10): 458-466.

**Moulin, L., Munve, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C., (2001).** Nodulation of legumes by members of  $\beta$  subclass of Proteobacteria. Nature. 411: 948-950.

---

	<b>N</b>	
--	----------	--

---

**Niste et ses collaborateurs, (2015)** Isolation and Biochemical Characterization of *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti* using API 20 NE and API 20 E.

---

	<b>O</b>	
--	----------	--

---

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

**Oldroyd, G.E. et Downie, J.A., 2008.** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, pp.519-546.

---

	<b>R</b>	
--	----------	--

---

**Reinhold-Hurek B, Chen W X (2000)** *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. In arid saline soils in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1887-1891.

**Reinhold-Hurek B, Chen W X (2000)** *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. In arid saline soils in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1887-1891.

---

	<b>S</b>	
--	----------	--

---

**Sahgal M, Johri BN (2003)** The changing face of rhizobial systematics. *Current Science* 84:43-48.

**Salehi M, Salehi F, Poustini K, Heidari-Sharifabad H, 2008.** The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4:413-415.

**Serraj R, Roy G, Devron JJ, 1994.** Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and their permeability to oxygen diffusion. *Physiol Plant* 91:161-168.

**Serrat R, 2002.** Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stress. *PhysiologyMolecular Biology Plant* 8: 77-86.

**Somasegaran P., Hoben H.J. 1994.** Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobia technology. P.450.Springer-Verlag.new York.

**Soussi M, Khadri M, Lluch C, Ocana A, 2001.** Carbon metabolism and bacteroid respiration in nodules of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) plants grown under saline conditions. *Plant Biosyst* 135(2):157-164.

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

---

	<b>T</b>	
--	----------	--

**Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE (1992)** Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and Ti plasmids. *Plant Cell Rep.* 11: 113-117.

**Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena AK, Shekhar Nautiyal C, Mittal S, Tripathi AK, Johri BN (2005)** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150.

---

	<b>V</b>	
--	----------	--

**Vincent JM (1970)** A manual for the practical study of root-nodule bacteria, IBP handbook, N° 75, Blackwells, Oxford.

---

	<b>W</b>	
--	----------	--

**Wang, D., Yang, S., Tang, F. and Zhu, H., 2012.** Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3), pp.334-342.

**Werner, D., 1992.** Symbiosis of plants and microbes. Chapman & Hall. Germany. Burton 1985.

---

	<b>W</b>	
--	----------	--

**Young ND, Steven BC, Shusei S, Dongjin K, Douglas RC, Chris DT, Bruce AR, Satoshi T (2005)** Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 137: 1174–1181.

---

	<b>Z</b>	
--	----------	--

**Zahran, H.H., 1999.** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), pp.968-989.



*Annexes*

## Annexe I :

### Milieux de culture utilisés pour la croissance des Rhizobia

#### ❖ Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent., 1970).

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5g
Mg SO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillée, qsp.....	1000ml

- pH ajusté à 6,8.
- Autoclavage 120°C pendant 20min.
- On met 200 ml sur les boîtes de pétri de 90mm et 100 ml sur les tube a vise.

#### ❖ Milieu YMA (YeastManitol Agar) en g/l (Vincent., 1970)

YMB .....	700ml
Agar.....	12.5g

- pH ajusté à 6,8.
- Autoclavage 120°C pendant 20min.

#### ❖ Milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

YMB .....	700ml
Agar.....	12.5g
Solution de rouge congo .....	7ml

- pH ajusté à 6,8.
- Autoclavage 120°C pendant 20min.
- Après l'ajustement de pH on ajoute 07 ml de Rouge Congo (0.25 g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillé) puis on ajoute l'agar.

#### ❖ Composition du milieu de Glucose Peptone Agar (GPA) + pourore de bromocrésol (BCP) (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose .....	05g
Peptone.....	2.5g
Pourore de bromocrésol .....	05 ml
Agar.....	09g
Eau distillée, qsp.....	500ml



- **Solution de pourpre de Bromocrésol :**

Pourpre de bromocrésol.....	0.1 g
Ethanol.....	10 ml

- pH

ajusté à 6,8.

- Autoclavage 120°C pendant 20min.

❖ **Milieu du 3-Cétolactose**

• Milieu A :

Glucose .....	10g
Extrait de levure.....	5g
Carbonate de calcium.....	10 g
Agar.....	09g
Eau distillée, qsp.....	500ml

- pH ajusté à 6,8.

Une anse de ce milieu estensemencée sur milieu solide contenant :

• Milieu B :

Lactose .....	05g
Extrait de levure.....	0.5g
Agar.....	09g
Eau distillée, qsp.....	500ml

- pH ajusté à 6,8.

- Autoclavage 120°C pendant 20min.

Les boîtes sont incubées 3 jours à 28°C. Les résultats sont mis en évidence par

L'inondation des boîtes avec les réactifs de Benedict à température ambiante :

Citrate de sodium .....	86.5g
Carbonate de sodium anhydre.....	50g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O.....	8.75g
Eau distillée, qsp.....	500ml

## **Annexe II :**

### **❖ Coloration de Gram**

- Réaliser un frottis

Sur une lame, on dépose une goutte d'eau stérile, ensuite avec l'anse de platine stérilisée on ajoute une goutte de la colonie isolée, puis on étale et on fixe à la chaleur.

- Réalisation de la coloration
  - Immerger les lames dans la solution de violet de gentiane pendant 1 mm.
  - Immerger les lames dans du Lugol pendant 30s.
  - Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée.
  - Laver à l'eau distillée.
  - Recoloration a la fuschine. Laisser agir pendant 1 mm.
  - Laver à l'eau distillée et sécher à l'air.
  - Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile de paraffine.

**Annexe III : API 20NE teste d'identification les non entérobactéries.**

TESTS	REACTION	NIGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	incolore	Rose - rouge
TRP	L-tryptophane	Incolore/ jaune	rose
GLU	D-glucose	Blue/vert	jaune
ADH	L-arginine	jaune	Orange/rose
URE	Urée	jaune	Orange/rose
ESC	Esculine: citrate de fer	jaune	gris/noir
GEL	Gelatine	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	incolore	jaune
GLU	Glucose assimilation	Transparence	trouble
ARA	Arabinose assimilation	Transparence	trouble
MNE	Mannose assimilation	Transparence	trouble
MAN	Mannitol assimilation	Transparence	trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine assimilation	Transparence	trouble
MAL	Maltose assimilation	Transparence	trouble
GNT	Gluconate assimilation	Transparence	trouble
CAP	Caprate assimilation	Transparence	trouble
ADI	Adipate assimilation	Transparence	trouble
MLT	Malate assimilation	Transparence	trouble
CIT	Citrate assimilation	Transparence	trouble
PAC	Phenyl-acetate assimilation	Transparence	trouble

## **INTITULÉ : Isolement et caractérisation de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

### **Résumé :**

Le présent travail porte sur l'isolement et la caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* poussant à l'état spontanés en milieu salin. Nous avons choisi comme lieu d'échantillonnage la région de Collo (wilaya Skikda) et les isollements ont été réalisés à partir de dix nodules différents. L'étude des caractères morphologiques et culturels montrent que les bactéries isolées appartiennent au genre *Rhizobium*. Les résultats obtenus par caractérisation biochimique sur galeries *API 20NE* révèle une différence dans le pouvoir d'assimilation des différents substrats ce qui renseigne sur l'existence d'une diversité de l'équipement enzymatique entre les différentes souches isolées.

**Mots clés :** *Medicago truncatula*, *rhizobium*, Milieu salin, nodule.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoires de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), Université Constantine 1. Route Ain El-Bey. Constantine, Algérie.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme. BENABDOUN Faiza Meriem - M.C.B à UFM Constantine 1  
**Rapporteur :** Mr. TEMAGOULT Mahmoud - M.A.A à UFM Constantine 1  
**Examinatrice :** Mme. MAUGAL Rym tinhinen – M.C.B à INATAA Constantine 1

**Date de soutenance :** 25/06/2018