



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et Environnement

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse
***Trigonella gladiata* Stev.**

Présenté et soutenu par : *BENDAIRA Zineb*
FELTEN Souheila

Le : 11/07/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : *M. KITOUNI Mahmoud* (Professeur - UFM Constantine).
Rapporteur : *M. CHABBI Rabah* (Maître assistant A - UFM Constantine).
Examinatrice : *M^{me} BOUZERAIB Latifa* (Maître assistante A - UFM Constantine).

Année universitaire
2018 - 2019



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et Environnement

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse
***Trigonella gladiata* Stev.**

Présenté et soutenu par : **BENDAIRA Zineb**
FELTEN Souheila

Le : 11/07/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : **M. KITOUNI Mahmoud** (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : **M. CHABBI Rabah** (Maître assistant A - UFM Constantine),
Examinatrice : **M^{me} BOUZERAIB Latifa** (Maître assistante A - UFM Constantine).

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciements

Au terme de notre Master, nous nous faisons l'agréable devoir de présenter nos remerciements les plus chaleureux et les plus vifs à M. CHABBI Rabah «Maître Assistant A » à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son entière disponibilité, ses grandes aides, ses orientations, ses précieux conseils, sa patience et surtout sa confiance.

Nous lui sommes reconnaissantes aussi d'avoir suscité en nous la passion du devoir accompli.

Nous tenons à remercier également M. KITOUNI Mahmoud «Professeur» à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 en nous faisant l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire.

C'est aussi avec plaisir, que nous exprimons nos remerciements à M^{me} BOUZERAIB Latifa «Maître assistante A» à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, qui a bien voulu examiner notre travail.

Que toutes ces personnes trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

Remerciements

*Nous remercions chaleureusement M. BENHIZIA YACINE
« Professeur » et directeur du laboratoire de Biologie
Moléculaire et Cellulaire à l'Université des Frères Mentouri
Constantine 1, de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire,
ainsi que pour ses encouragements pour nous durant notre
parcours universitaire en Master.*

*Nous désirons aussi remercier M^{me} OULMI Lamia «Maitre de
conférence B» à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1,
pour ses multiples et incessantes aides.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à ceux qui
ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste
travail.*

Résumé

Ce travail est une contribution à la caractérisation phénotypique des isolats bactériens nodulant la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev., collectée dans la wilaya de Khenchela située dans l'Est algérien. Un total de onze isolats a été sélectionné. Ce sont des coccobacilles courts à Gram négatif et ceci après une étude microscopique et morphologique, suivi d'une étude des caractères culturels révélant une croissance rapide pour l'ensemble des isolats, ainsi que d'autres tests physiologiques, biochimiques et des tests nutritionnels. Selon les résultats obtenus, les isolats portent des caractères phénotypiques similaires aux (BNL). Bien que cette caractérisation reste insuffisante, Elle nous permet quand même d'établir des hypothèses quant à la taxonomie des isolats.

Mots Clés : Symbiose ; BNL ; Légumineuse ; *Trigonella gladiata* Stev. ; Caractérisation phénotypique.

Abstract

This work is a contribution to the phenotypic characterization of bacteria isolates nodulating wild legume *Trigonella gladiata* Stev., recovered in the state of Khenchela situated in Eastern Algeria. A total of eleven isolates of short Gram-negative coccobacillus bacteria were selected after microscopic and morphological study, followed by a study of the cultural characteristics, revealing a rapid growth for all the isolates, as well as physiological, biochemical and nutritional tests. According to the obtained results, isolated have phenotypic characters similar to (BNL). Although this characterization remains insufficient, it still allows us to make hypothesis about the taxonomy's isolates.

Keywords: Symbiosis; BNL; Legumes; *Trigonella gladiata* Stev.; Phenotypic characterization

ملخص

يعد هذا العمل مساهمة في الوصف المظهري للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية للنبات البقولي البري *Trigonella gladiata* Stev., التي تم تجميعها من ولاية خنشلة في الشرق الجزائري. مجموعة مكونة من إحدى عشرة عزلة تم اختيارها كعصيات قصيرة سالبة الغرام بعد دراسة ميكروسكوبية ومورفولوجية، متبوعة بدراسة للخصائص الزراعية التي كشفت عن نمو سريع لجميع العزلات بالإضافة الى اختبارات فيسيولوجية، بيوكيميائية وغذائية. حسب النتائج المتحصل عليها، العزلات تحمل خصائص مظهرية مشابهة للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية لدى البقوليات (BNL). بالرغم من كون هذه الاختبارات غير كافية، إلا أنها تسمح بوضع فرضيات حول تصنيف العزلات.

الكلمات المفتاحية: تعايش؛ بكتيريا العقد الجذرية؛ بقوليات؛ *Trigonella gladiata* Stev.؛ وصف مظهري.

Liste des Figures

Figure 1 : Aperçu du cycle de l'azote.....	02
Figure 2 : Variations morphologiques des nodules dans l'interaction rhizobia-légumineuse...	06
Figure 3 : Nouvelle Taxonomie des Leguminosae	08
Figure 4 : <i>Trigonella gladiata</i> Stev.	09
Figure 5 : Les symbiotes bactériens au sein des protéobactéries.....	10
Figure 6 : Etapes de développement d'un nodule dans une racine de Soja	12
Figure 7 : Photomicrographie électronique de groupe des bactéroïdes	13
Figure 8 : La formation des bactéroïdes, entourés d'une membrane pér bactéroidienne.....	13
Figure 9 : Nodule mature fixateur d'azote	14
Figure 10 : Le dialogue moléculaire <i>Rhizobium</i> -Légumineuse.....	15
Figure 11 : Structure chimique d'un facteur Nod de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	16
Figure 12 : Structure de la nitrogénase et les gènes nécessaires à sa biosynthèse.....	18
Figure 13 : Géolocalisation de la région du prélèvement.....	19
Figure 14 : Collecte des nodules	20
Figure 15 : Conservation des nodules	21
Figure 16 : Hotte à flux laminaire «STERIL BIO BAN modèle 48».....	21
Figure 17 : Ensemencement par la technique des cadrans.....	22
Figure 18 : Résultat du test de stérilisation.....	28
Figure 19 : Aspect visqueux des isolats sur YMA	29
Figure 20 : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur YMA+RC.....	29
Figure 21 : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur GPA+BCP.....	30
Figure 22 : Résultat du test de vitesse de croissance YMA+BTB.....	31
Figure 23 : Résultat de la coloration de Gram de l'isolat Tw9 (Objectif x100).....	31
Figure 24 : Résultat du test de la Nitrate-réductase.....	32
Figure 25 : Résultat de l'hydrolyse de l'urée chez l'isolat 5(N4).....	33
Figure 26 : Résultat de l'hydrolyse du CMC.....	34
Figure 27 : Résultat du test Oxydase- (Tw1) / Oxydase+ (Tw6).....	35
Figure 28 : Résultat du test Catalase.....	36
Figure 29 : Effet du pH sur la croissance des isolats.....	37
Figure 30 : Croissance de certains isolats à températures différentes.....	39
Figure 31 : Effet de stress salin sur la croissance des isolats.....	40
Figure 32 : Croissance de certains isolats en présence de différents sucres.....	42
Figure 33 : Croissance de certains isolats en présence de différents acides aminés.....	43

Liste des Tableaux

Tableau 01 :	Groupes procaryotes représentatif contenant des espèces fixatrices d'azote...	05
Tableau 02 :	Les isolats utilisés dans cette étude.....	28
Tableau 03 :	Observation de la croissance des isolats aux différentes températures.....	38
Tableau 04 :	Croissance des isolats en présence de différents sucres.....	41
Tableau 05 :	Croissance des isolats en présence de différents acides aminés.....	43

Liste des Abréviations

- ANDI :** Agence Nationale de Développement de l'Investissement
- BCP :** Pourpre de Bromocrésol
- BNL :** Bactéries Nodulant les Légumineuses.
- BTB:** Bromotymol Blue.
- CAS:** Chinese Academy of Sciences.
- CMC :** Carboxy méthyle cellulose..
- DC. :** Abréviations botaniques standard d'Augustin Pyrame de Candolle.
- DO :** Densité Optique.
- EPS :** Exopolysaccharides.
- GBIF:** the Global Biodiversity Information Facility.
- GlcNAc:** N-acétyl-D-glucosamine.
- KIB:** Kunming Institut of Botanique.
- L. :** Abréviations botaniques standard de Carl von Linné.
- LCOs:** lipochitooligosaccharidiques
- LPWG:** the Legume Phylogeny Working Group.
- RC :** Rouge Congo.
- Stev. :** Abréviations botaniques standard de Christian von Steven.
- Sym :** Symbiose.

Table des matières

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

Introduction 1

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1. L'azote	2
1.1. Cycle d'azote	2
1.2. La fixation biologique de l'azote	3
1.3. Diversité des microorganismes fixateurs d'azote.....	4
2. La symbiose BNL-légumineuse	5
2.1 La diversité des légumineuses	7
2.2 La diversité des Bactéries nodulant les légumineuses	10
3. Stratégie de nodulation	11
3.1 Pré infection (reconnaissance et attachement).....	11
3.2 Infection	11
3.3 Structure et développement du nodule.....	12
3.3.1 Nodules déterminés.....	14
3.3.2 Nodules indéterminés	14
4. Le dialogue moléculaire de l'interaction BNL-légumineuse	14
4.1 Les flavonoïdes	15
4.2 Les facteurs Nod (ou NFs).....	15
5. La génétique de la fixation symbiotique d'azote	16
5.1 Les gènes nod et leur localisation	16
5.2 Les gènes nod régulateurs.....	17
5.2.1 Les gènes nod communs	17
5.2.2 Les gènes nod spécifiques hsn « host specific nodulation ».....	17
5.3 Les gènes nif et les gènes fix :	17

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Isolement des bactéries nodulant le Fenugrec (<i>Trigonella gladiata</i> Stev.)	19
1.1. Description de la zone d'étude.....	19
1.2. Collecte des nodules	19
1.3. Conservation des nodules	20
1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules	21
1.4.1. Stérilisation de nodules	21

1.4.2. Test de stérilisation	22
1.4.3. Ecrasement des nodules	22
1.4.4. Isolement des bactéries	22
2. Caractères cultureux	23
2.1. Principaux milieux de culture utilisés.....	23
2.2. Purification des isolats	23
2.3. L'examen visuel des colonies	23
2.4. Test de la vitesse de croissance.....	23
2.5. Conservation des isolats.....	24
2.6. Examen microscopique après coloration de Gram	24
3. Caractéristiques phénotypiques des isolats	24
3.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques)	24
3.1.1. Réduction des nitrates	24
3.1.2. Hydrolyse de l'urée.....	25
3.1.3. Activité cellulolytique :	25
3.1.4. Recherche de l'oxydase	25
3.1.5. Recherche de catalase	26
3.2. Tests physiologiques (influence des facteurs abiotiques).....	26
3.2.1. Effet de pH.....	26
3.2.2. Effet de la température.....	26
3.2.3. Effet du Chlorure de Sodium	26
3.3. Tests nutritionnels.....	27
3.3.1. Sources de carbone	27
3.3.2. Sources de l'azote	27

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Isolement des bactéries à partir des nodules	28
2. Caractères cultureux	28
2.1. Purification des isolats	28
2.2. L'examen visuel des colonies	28
2.2.1. Croissance sur milieu YMA	28
2.2.2. Croissance sur milieu YMA + rouge Congo	29
2.2.3. Croissance sur milieu GPA + BCP	29
2.3. Test de la vitesse de croissance.....	30
2.4. Examen microscopique après coloration de Gram	31
3. Caractéristiques phénotypiques des isolats	32

3.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques)	32
3.1.1. Réduction des nitrates	32
3.1.2. Hydrolyse de l'urée.....	33
3.1.3. Activité cellulolytique.....	34
3.1.4. Recherche de l'oxydase	35
3.1.5. Recherche de catalase	35
3.2. Tests physiologiques (influence des facteurs abiotiques).....	36
3.2.1. Effet du pH.....	36
3.2.2. Effet de la température.....	37
3.2.3. Effet du Chlorure de Sodium	39
3.3. Tests nutritionnels.....	41
3.3.1. Sources de carbone	41
3.3.2. Source de l'azote.....	42
Conclusion	44
Références Bibliographiques	46
Annexes	

Introduction

Etant donné que l'azote est un élément indispensable pour le développement des plantes, et que ses formes assimilables par celles-ci sont réduites qualitativement (seulement en Nitrates NO_3^- ou Ammonium NH_4^+) et quantitativement dans le sol, l'insertion empirique des légumineuses dans la succession de culture répondait parfaitement aux besoins précédemment cités. Ceci revient à leur capacité à établir une relation symbiotique fixatrice d'azote atmosphérique N_2 avec les bactéries du sol appelées BNL impliquées dans la formation des nodules racinaires.

Cette association contribuant naturellement à l'enrichissement des sols en azote et à l'accroissement du rendement des cultures, réduit les besoins en engrais azotés minéraux et diminue le risque de pollution du sol et de l'eau, d'où l'intérêt des engrais verts constitués d'inoculum de BNL préalablement isolées, étudiées et sélectionnées en fonction de leur infectivité et efficacité.

Dans cette optique et dans le cadre de la recherche des bactéries symbiotiques efficaces, les BNL colonisant les racines de la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev. en présente un modèle demeurant peu étudié au niveau national.

Par conséquent, dans le but d'isoler et de caractériser phénotypiquement les bactéries nodulant la plante suscitée, nous consacrons une partie de notre travail à l'étude de la relation entretenue entre cette plante et leurs infecteurs.

Dans une autre partie, nous mettrons en évidence les caractéristiques morphologiques, culturales, biochimiques et nutritionnelles des isolats, qui constitueront le volet pratique de notre étude.

Chapitre 1

Synthèse

Bibliographique

1. L'azote

De même que le carbone (C), l'azote est un élément indispensable pour la vie de tous les organismes vivants. Il représente un composant majeur des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques (ADN, ARN), et des coenzymes. Il se retrouve également dans le pigment photosynthétique (la chlorophylle) et dans d'autres molécules d'intérêt telles que l'ATP. Aussi, il constitue un facteur limitant de croissance des producteurs dans de nombreux écosystèmes lorsqu'il ne soit pas abondant dans le sol et dans l'eau à l'état naturel (Roba, 2016).

1.1. Cycle d'azote

Afin de permettre la circulation et la recirculation des quantités limitées d'azote dans le monde vivant, un cycle d'azote (Figure 01) s'impose en trois (03) principales étapes : Ammonification ; nitrification et assimilation (Raven *et al.*, 2014).

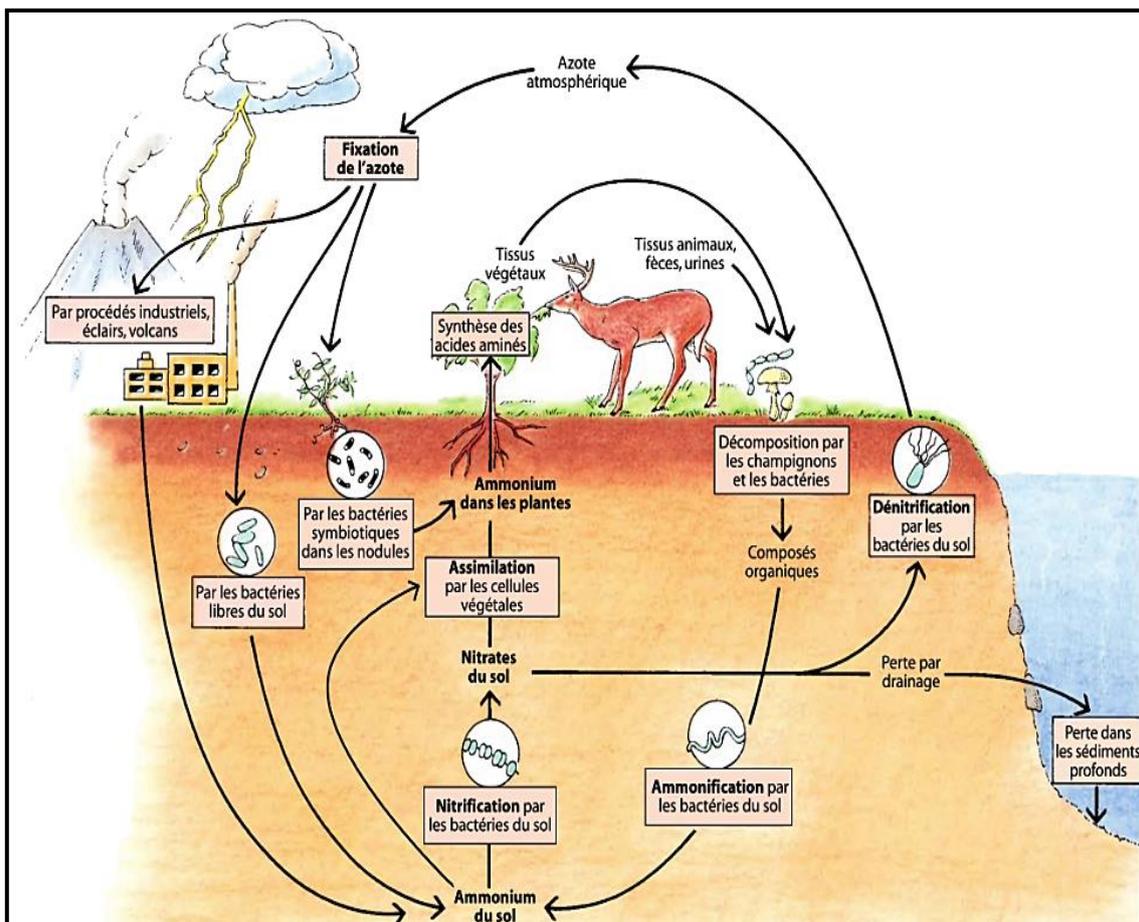


Figure 1 : Aperçu du cycle de l'azote. (Raven *et al.*, 2014).

Il est important de noter que le cycle d'azote ne peut être accompli sans l'action des microorganismes qui interviennent comme suit :

a) Ammonification

Les décomposeurs, dont certains champignons et des bactéries ammonifiantes sont capables de transformer l'azote issu de la décomposition de la matière organique en ammoniac (NH_3) et ion ammonium (NH_4^+) (Raven *et al.*, 2007).

b) Nitrification

Elle consiste en oxydation de l'ammoniac en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-). Les bactéries terrestres assurent la nitrification, selon deux étapes. Tout d'abord, l'oxydation des ions ammonium en nitrites par des bactéries du genre *Nitrosomonas*, ensuite les nitrites sont oxydés en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter*. Le nitrate est assimilé par la plante (Raven *et al.*, 2007).

c) Dénitrification

C'est dans une atmosphère d'anaérobiose que se déroule la réduction du nitrate (NO_3^-) en diazote (N_2). Les bactéries dénitrifiantes accomplissent ce processus, elles inversent l'action de fixation de l'azote et la nitrification des bactéries, et cela en reproduisant l'azote atmosphérique (Raven *et al.*, 2007). Il se peut aussi et à cause de sa solubilité élevée dans l'eau, l'azote en forme d'ammoniac ou nitrates non consommées ou non assimilées s'accumulent dans les eaux de ruissèlement et d'infiltration (Figure 1), ce qui pourra favoriser le développement des algues qui constituent un facteur d'accélération du processus de la pollution une fois non consommées (Suty, 2015).

d) Fixation d'azote

Il s'agit du processus biochimique et physiologique via lequel les procaryotes transforment l'azote atmosphérique en ammoniac par la réduction du diazote (N_2) (William et Hopkins, 2003).

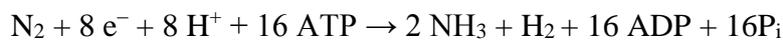
1.2. La fixation biologique de l'azote

L'atmosphère terrestre est le plus vaste réservoir de l'azote atmosphérique (N_2) (environ 80% de la masse d'atmosphère) ; mais pour la plupart des organismes, cette forme gazeuse d'azote n'est pas consommable, à l'exemple des plantes, l'azote n'est accessible que sous forme de Nitrate (NO_3^-) et d'Ammonium (NH_4^+) (Roba, 2016). Les deux atomes formant le diazote (qui est chimiquement inerte) sont reliés par des liaisons exceptionnellement stables que les plantes sont incapables de rompre. Elles sont donc dépendues d'organismes procaryotiques essentiellement les bactéries qui possèdent la nitrogénase qui est une enzyme capable de réduire

l'azote atmosphérique dont les cellules eucaryotes sont totalement dépourvues, la vitesse du processus de fixation limite la croissance végétale dans beaucoup de situations (Shingh, 2017).

1.2.1. La nitrogénase

La **nitrogénase** est une métalloprotéine contenant des centres de fer-soufre et un cofacteur avec à la fois du fer et du molybdène. Son intervention dans la réduction du (N₂) en (NH₃) est une réaction très exergonique, elle nécessite aussi une grande dépense d'ATP (haute énergie d'activation) puisque l'azote moléculaire est un gaz non réactif et possède une triple liaison entre les deux atomes. Au moins 8 électrons et 16 molécules d'ATP par paire d'électron sont requis (Willey *et al.*, 2018 et Pratt et Cornely, 2019). La réaction nette est :



Dans un environnement aérobie, la nitrogénase s'inactive rapidement vu qu'elle est très sensible à la présence d'oxygène. Pour cela et à fin d'assurer sa protection et son bon fonctionnement dans une cellule, de nombreuses bactéries fixatrices d'azote sont confinées aux habitats anaérobies ou effectuent la fixation d'azote quand l'oxygène se raréfie (Pratt et Cornely, 2019). Par exemple chez beaucoup de cyanobactéries, cette protection est assurée par une structure spéciale appelée **hétérocyste** (Prescott *et al.*, 2010). Tandis que chez les plantes dites légumineuses, la fixation symbiotique de l'azote se déroule à l'intérieur des nodules racinaires, ce qui confère une niche protectrice à ce complexe enzymatique en plus de la présence la **Leghémoglobine** (protéine végétale) qui va protéger la nitrogénase en fixant l'oxygène et en le maintenant à une faible pression partielle (Suty, 2015).

1.3. Diversité des microorganismes fixateurs d'azote

La fixation de l'azote se produit chez :

➤ Des bactéries libres et des archées

Ces bactéries peuvent être aérobies (*Azotobacter*), anaérobies (*Clostridium*), aérobies facultatives (*Klebsiella*) et même des méthanogènes (*Methanococcus*) (Tableau 1) (Rai *et al.*, 2000).

➤ Les cyanobactéries (*Nostoc*, *Anabaena* et *Trichodesmia*)

Beaucoup de cyanobactéries filamenteuses fixent l'azote atmosphérique via les hétérocystes dotés seulement du photosystème I qui est responsable de la production de l'ATP sans la libération d'oxygène. Grâce à leur paroi épaisse et étanche au dioxyde, ce dernier sera entièrement épuisé par la respiration, d'où le maintien de l'anaérobiose et la fixation de l'azote. D'autres cyanobactéries dépourvues des hétérocystes fixent aussi l'azote dans des conditions

d'anoxie et d'obscurité et c'est le cas des formes planctoniques comme *Trichodesmium* (Prescott *et al.*, 2010). Un petit nombre d'associations symbiotiques étudiées, sans formation des nodules racinaires comme l'association *Azolla* (fougère aquatique) abritant *Anabeana* (*Cyanobacteria*) dans les cavités de ses feuilles constitue un autre cas de figure de la fixation d'azote (Tableau 1) (Rai *et al.*, 2000).

➤ **Des bactéries vivantes en symbiose avec des plantes**

Les *rhizobiums* (bactéries Gram négatif) fixant l'azote atmosphérique dans des nodules qu'ils développent à l'intérieur des racines des plantes dites légumineuses.

Les Actinorhizes sont aussi un exemple de la fixation symbiotique de l'azote, elles existent entre l'actinomycète *Frankia* et plusieurs familles des plantes non légumineuses et aboutissent aussi à la formation des nodules racinaires (Tableau 1) (Prescott *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Groupes procaryotes représentatif contenant des espèces fixatrices d'azote (Perry *et al.*, 2004).

I. Bacteria	A. Non symbiotiques	1. Photosynthétiques
		<i>Proteobactérie</i> <i>Chlorobi</i> <i>Cyanobacteria</i>
	B. Symbiotes bactériens	2. Hétérotrophes
		<i>Azotobacter</i> <i>Clostridium</i> Quelques spirochètes
B. Symbiotes bactériens		<i>Rhizobium</i> (légumineuses) <i>Frankia</i> (aulnes) <i>Cyanobacteria</i> (lichens ; <i>Azolla</i>)
II. Archaea		Méthanogènes

2. La symbiose BNL-légumineuse

Parmi les relations intimes du type symbiotique, l'interaction qui existe entre *Rhizobium* et les plantes légumineuses est considérée comme étant une interaction hautement spécifique *Rhizobium*-légumineuse puisque son établissement n'est que le résultat des mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux partenaires à travers un dialogue moléculaire durant lequel, les bactéries des genres *Rhizobium* induisent la formation sur les racines des plantes légumineuses des organes spécialisés, les nodules, qui sont le siège de la fixation de

l'azote. A l'intérieur de ces nodules, les bactéries se différencient en bactéroïdes et via le complexe nitrogénase réduisent l'azote atmosphérique (N_2) en Ammonium (NH_4^+), qui est un véritable engrais naturel, d'où l'intérêt considérable de l'exploitation des légumineuses dans la réhabilitation de milieux perturbés dans certains pays du bassin méditerranéen (Requena *et al.*, 2001) ou la végétalisation de sites miniers après exploitation à ciel ouvert (Jaffré *et al.*, 1995 ; Franco et de Faria, 1997 ; Dommergues *et al.*, 1999).

En retour, les bactéries reçoivent de leur légumineuse hôte, du carbone et de l'énergie sous forme d'acide dicarboxyliques issus de la photosynthèse. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires. L'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses est très diverse et implique de nombreuses espèces chez les deux partenaires, végétal et bactérien (Bagnères et Hossaert-Mckey, 2017; Perret *et al.*, 2000 ; Gibson *et al.*, 2008). Alors qu'autrefois, on croyait que les racines d'une légumineuse donnée ne pouvaient être nodulées que par un groupe spécifique de rhizobia. Mais jusqu'à présent, il a été démontré que plusieurs groupes rhizobiales appartenant à des espèces différentes pouvaient le faire (Neelawan, 2012).

Une autre association intéressante qu'on trouve particulièrement chez les légumineuses tropicales et les *Rhizobium* à nodules caulinaires (Figure 2), Ces nodules se forment à la base des racines adventices, qui émergent de la tige juste au-dessus de la surface du sol. Elles disposent de mécanismes particuliers pour protéger les enzymes de fixation de l'azote qui sont sensibles à l'oxygène, puisqu'ils contiennent des tissus photosynthétiques producteurs d'oxygène. Comme *Azorhizobium caulinodans* est un autre micro-organisme qui forme de tels nodules caulinaires. On les trouve chez les légumineuses tropicales *Sesbania rostrata* (Prescott *et al.*, 2010).

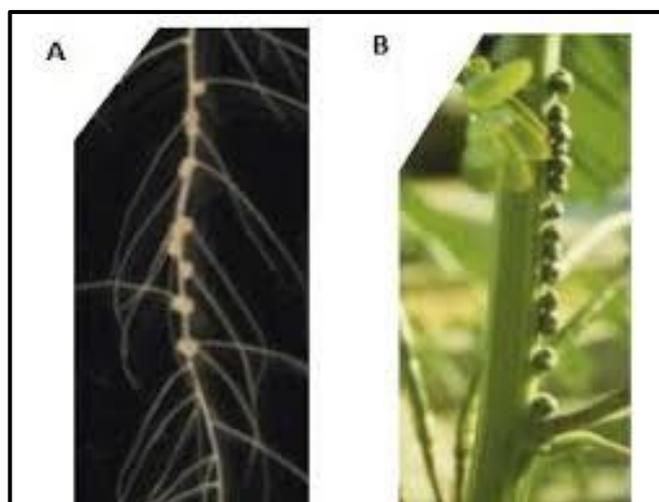


Figure 2 : Variations morphologiques des nodules dans l'interaction rhizobia-légumineuse. (A) Nodules déterminés racinaires ; (B) Nodules caulinaires (Mbengue, 2010).

2.1 La diversité des légumineuses

Les Leguminosae (ou Fabaceae) est l'une des trois familles (à côté des Orchidaceae et les Asteraceae) constituant la classe des Dicotyledonae (LPWG, 2017). Elle comprend plus de 19500 espèces regroupées en 765 genres, dont 88% des espèces sont capables de fixer l'azote en formant des nodules racinaires aidant ainsi à réduire la consommation des engrais azotés chimiques (CAS, 2017).

Cette famille cosmopolite, est retrouvée particulièrement dans les régions subtropicales et tempérées chaudes (Afrique du sud ou sur le pourtour méditerranéen). Ces plantes peuvent être des arbres, des arbustes ou des lianes ligneuses, caduques ou persistantes, ou encore des herbes annuelles, vivaces ou pluriannuelles.

Habituellement, la division des *Fabaceae* en trois sous-familles « les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* est universellement adoptée par les différents ouvrages de taxonomie. Cependant, de récentes études moléculaires indiquent que cette classification n'est pas naturelle car les *Mimosoideae* et *Papilionoideae* monophylétiques sont nichées dans la sous famille des *Caesalpinioideae* paraphylétique ; pour cela le professeur YI Tingshuang, Institut de Botanique de Kunming (KIB) -Académie Chinoise des Sciences (CAS)- a proposé dans une de ses participations, une nouvelle classification des légumineuses qui reconnaît les six sous-familles que le site *PlantUse-Français.org* a rapporté comme suit (Figure 3) :

- *Duparquetioideae* (LPWG, 2017) : 01 genre, 01 espèce
- *Cercidoideae* (LPWG, 2017) : 12 genres, regroupant 335 espèces : par exemple *Bauhinia*, *Cercis*
- *Detarioideae* Burmeist. : 84 genres, constitués de 760 espèces : par exemple *Tamarindus*
- *Dialioideae* (LPWG, 2017) : 17 genres, qui comportent 85 espèces.
- *Caesalpinioideae* DC. (y compris le clade des mimosoïdes) : 148 genres, rassemblant 4400 espèces : par exemple *Caesalpinia*, *Cassia*, *Ceratonia*, *Delonix*, *Leucaena*, *Senna* plus les Mimosoïdes.
- *Papilionoideae* DC. : 503 genres, qui comprennent 14.000 espèces.

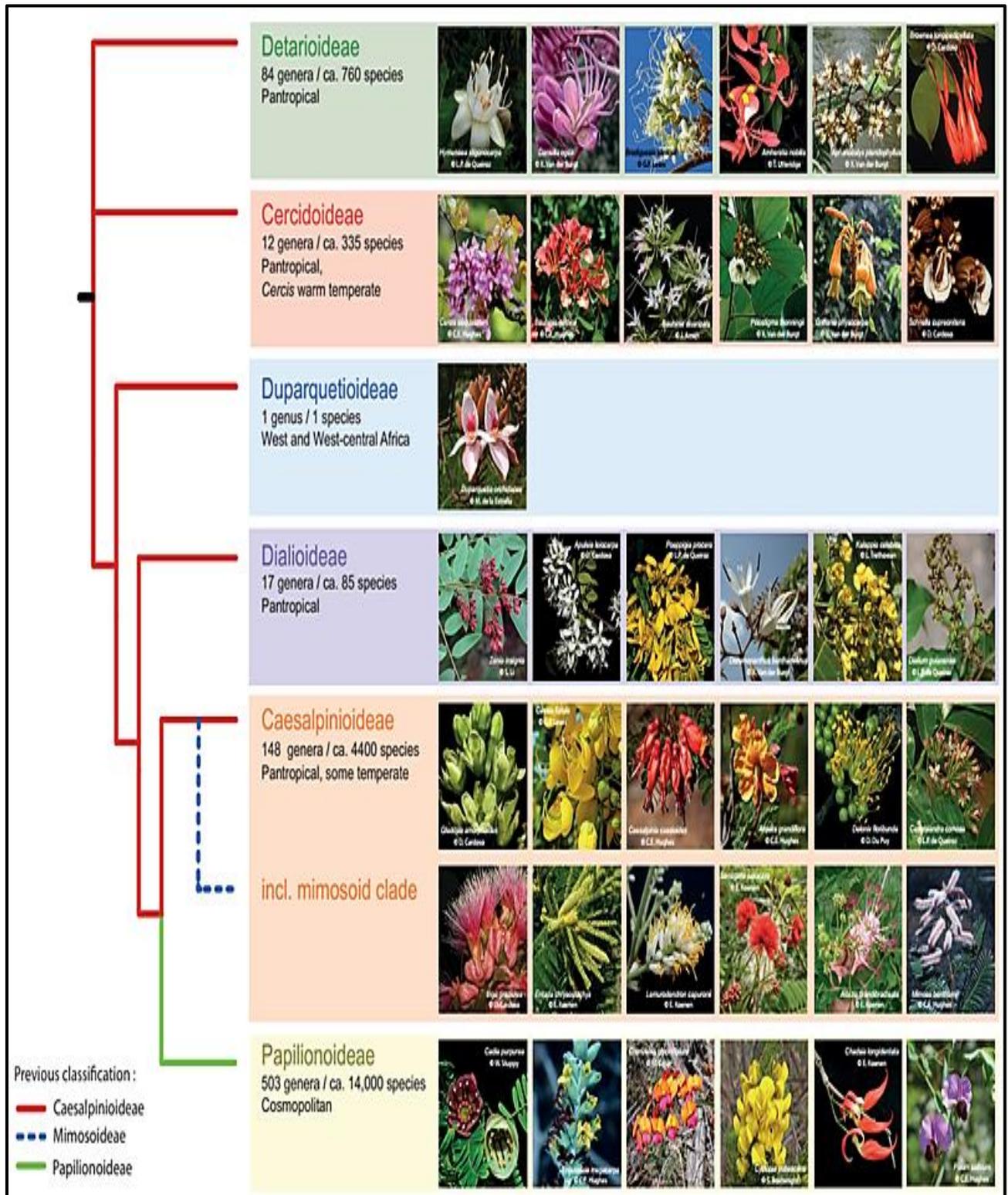


Figure 3 : Nouvelle Taxonomie des Leguminosae en six sous-familles (LPWG., 2017)

Cette nouvelle classification de la famille des légumineuses, représentant l'opinion unanime de la communauté internationale de la systématique des légumineuses, aborde le problème de la non-monophylie connue depuis longtemps de la sous-famille reconnue Caesalpinioideae, en reconnaissant six sous-familles monophylétiques qui repose sur un support robuste. L'ancienne sous-famille des Mimosoideae est nichée au sein de la Caesalpinioideae circonscrite et est désigné de manière informelle comme le clade Mimosoïde.

Dans cette nouvelle classification, les chercheurs se sont basé principalement sur l'analyse phylogénétique des légumineuses, notamment les séquences du gène *matK* des plastides, qui sont les plus variables chez les légumineuses et leurs analyse aboutit à des clades bien supportés (LPWG., 2017).

Parmi les plantes appartenant à la famille des Fabacées, on retrouve le genre *Trigonella* appelé aussi Fenugrec.

2.1.1 Le genre *Trigonella* L.

La *Trigonella* L. est une plante herbacée annuelle, à feuilles trifoliolées, à folioles denticulées, ayant deux stipules. Elle donne naissance à des fruits en forme de gousses linéaires ou oblongue, déhiscente ou non et rostrée (Quézel et Santa, 1962).

En Agriculture biologique, le fenugrec commence à prendre une importante place dans la formulation des engrais verts composés d'espèces destinées à l'interculture dans les systèmes céréaliers (Schneider et Huyghe, 2015).

➤ *Trigonella gladiata* Stev.

L'espèce *Trigonella gladiata* Stev., mesurant entre 5 et 15 cm. Elle est plus ou moins prostrée, donnant des gousses longues d'une taille de 2 à 4 cm qui se rétrécissent brusquement en bec de 1 à 2 cm, des fleurs blanchâtres de 8 à 10 mm, et des graines fortement tuberculées (Figure 4).

Elle se répartie dans toutes l'Algérie sauf dans la zone Côtière (Quézel et Santa, 1962).

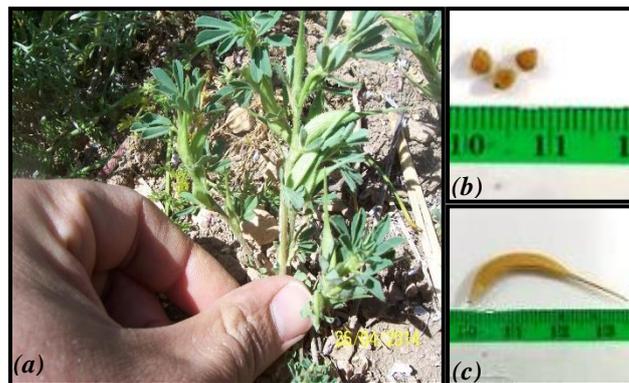


Figure 4: *Trigonella gladiata* Stev.
(a) Pied, (b) graines, (c) Gousse.

Malgré la nouvelle classification des légumineuses sus-citée, aucune modification n'a été apporté à la position taxinomique du genre *Trigonella* L. (LPWG., 2017), et de ce fait la position taxonomique de *Trigonella gladiata* Stev. est la suivante :

Règne : Plantae

Ordre : Fabales

Embranchement : Tracheophyta

Famille : Fabaceae

Classe : Magnoliopsida

Genre : *Trigonella*

Espèce: *Trigonella gladiata* Stev. (GBIF Backbone Taxonomy, 2017)

2.2 La diversité des Bactéries nodulant les légumineuses

Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) appelées au paravent Rhizobia regroupent des groupes différents de bactéries spécifiques ayant la capacité d'induire la fixation symbiotique de l'azote en formant des nodules racinaires ou même sur les tiges des légumineuses (Raven *et al.*, 2014).

Actuellement, les rhizobiums sont répartis dans **13 genres** et **98 espèces**, dont la plupart appartiennent à la famille des Rhizobiaceae, classe des *Alpha-Proteobacteria* regroupées en plusieurs genres tels que *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, et *Bradyrhizobium*. Tandis que les genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* font partie de la classe de *Beta-Proteobacteria* (Weir, 2016) (Figure 5).

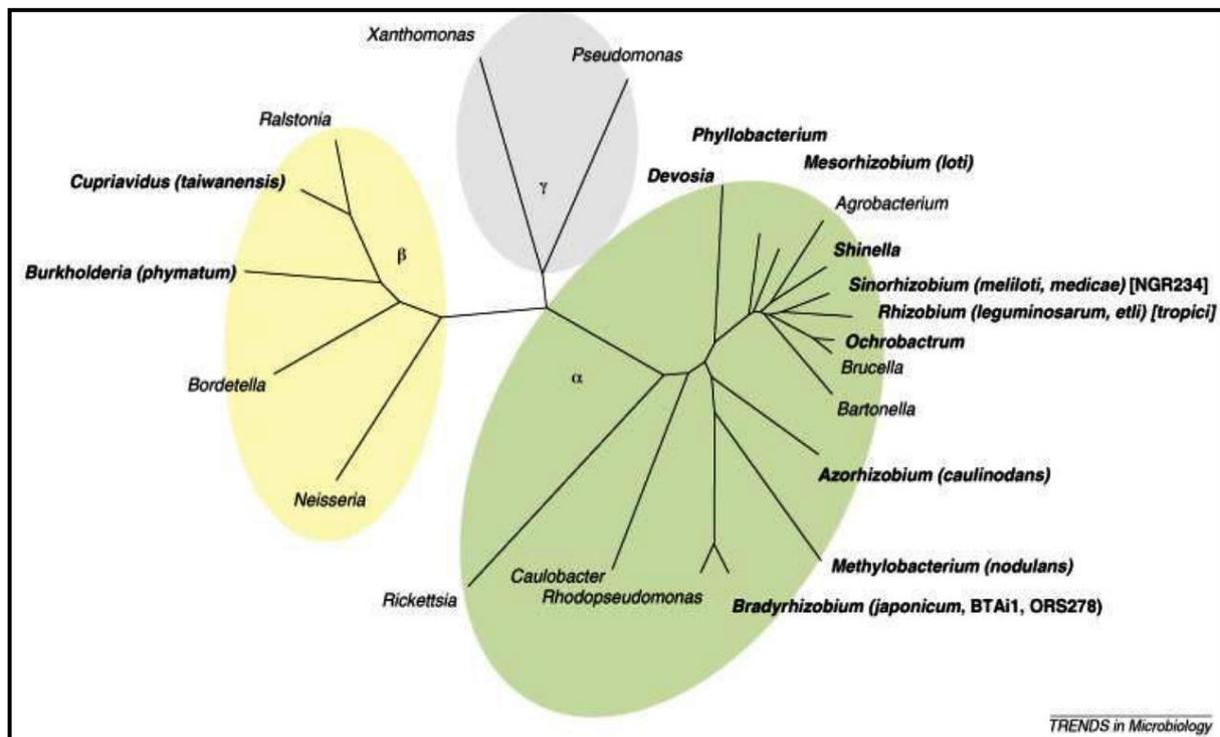


Figure 5 : Les symbiotes bactériens au sein des protéobactéries (Domergue, 2017).

Cependant, de récentes études ont démontré l'existence d'espèces supplémentaires autres que celles citées précédemment et qui peuvent avoir acquis la capacité de nodulation suite à un transfert horizontal des gènes symbiotiques (Weir, 2016).

En 2004, Benhizia et ses collaborateurs ont suggéré que des bactéries appartenant à la classe *Gamma-Proteobacteria* pouvaient, elles aussi, noduler les racines de la plante fourragère *Hedysarum* sans qu'il y ait une validation. Mais en 2010, d'autres études menées par Shiraishi et son équipe qui portaient sur la nodulation chez *Robinia pseudoacacia* confirmaient cette théorie, et ceci en isolant des bactéries du genre *Pseudomonas sp.* (Kumar *et al.*, 2017).

3. Stratégie de nodulation

L'interaction rhizobium-légumineuse est très complexe, il a été montré qu'elle est initiée par un dialogue moléculaire au sein duquel des signaux moléculaires produits par ces deux partenaires jouent un rôle clé. Cette association passe par une série d'étapes complexes (Briat et Job, 2017) citées ci-dessous

3.1 Pré infection (reconnaissance et attachement)

L'interaction débute par un échange des signaux moléculaires spécifique entre la plante et la bactérie. La plante attire les rhizobiums dans le voisinage des racines de manière non spécifique par chimiotactisme grâce aux composés exsudés dans leur rhizosphère dits **Flavonoïdes**, ces derniers déclenchent la production des molécules de transmission d'origine bactérienne appelées les **facteurs Nod** suite l'induction des gènes *nod* (gènes de nodulation). (Figure 6-a) (Prescott *et al.*, 2010).

Les facteurs Nod produits par les rhizobiums stimulent la division cellulaire au niveau des poils absorbants. Ceux-ci vont s'incurver pour prendre la forme d'une houlette de berger. Ils piègent ainsi les bactéries (Figure 6-b) (Perry *et al.*, 2004 ; Prescott *et al.*, 2010) .

Les bactéries s'attachent aux racines de la plante grâce à une molécule d'adhésion spécifique appelée « Rhicadhésine » présente à la surface des cellules bactérienne appartenant au genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* et grâce aussi aux récepteurs spécifiques présents au niveau des parois des cellules végétales (Prescott *et al.*, 2010 ; Perry *et al.*, 2004 ; Mbengue, 2010).

3.2 Infection

Grace à un mécanisme d'invagination, les bactéries peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules végétales ; ce qui entraîne le développement d'une excroissance remplie de bactéries, qu'on appelle le filament infectieux (Figure 6-c). Ce filament se développe dans le cortex de la racine, vers la base de la cellule constituant le poil radiculaire jusqu'à une région appelée le Primordium. C'est cette division cellulaire qui aboutit à la formation d'une nodosité. (Prescott

et *al.*, 2010). Ce mécanisme d'infection est le plus étudiés et le plus courant, il a été observé chez les légumineuses tempérées : le pois, le Soja, ...etc (Selami, 2015).

Le "**Crack Entry**" constitue aussi un autre mécanisme d'infection, qui se déroule par voie intercellulaire ou entrée par fissure. Ce mode d'infection est connu chez les légumineuses de type tropical et subtropical. Dans ce cas, l'infection bactérienne se fait au niveau des fissures formées lors de l'émergence des racines latérales, les bactéries profitent de ces blessures pour coloniser l'espace intercellulaire et former des poches d'infection, parfois, elles pénètrent directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme. Les poches formées lors de l'infection donnent naissance aux cordons d'infection qui se développent pour infecter les primordia nodulaires formés au niveau du cortex interne moyen (Mbengue, 2010 ; Selami, 2015).

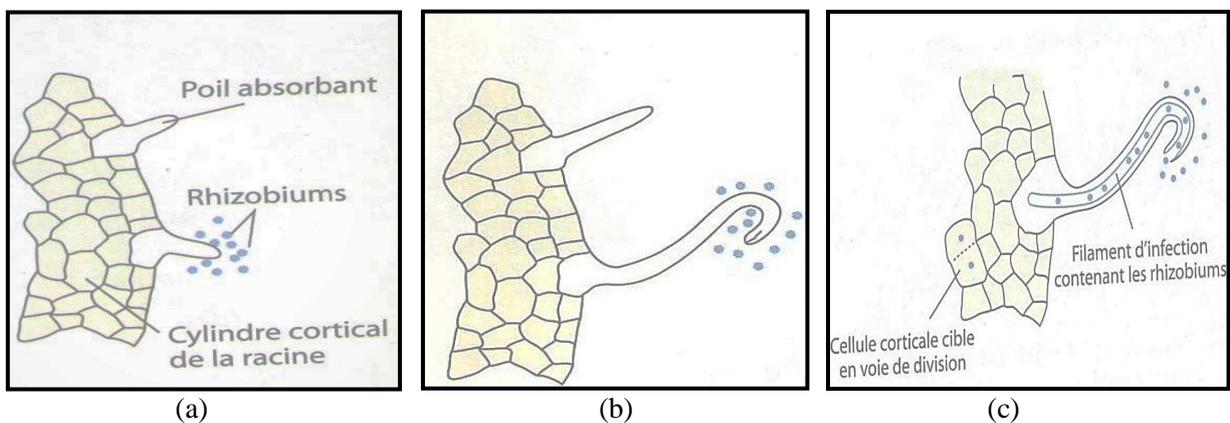


Figure 6 : Etapes de développement d'un nodule dans une racine de Soja (Raven *et al.*, 2014).

3.3 Structure et développement du nodule

Suite à l'infection, l'organogenèse d'un nouvel organe se met en place, cet organe qui est le nodule constitue une niche pour les bactéries. Après leurs libérations du cordon par endocytose dans le primordium nodulaire différencié en nodule mature, les bactéries sont intégrées au cytoplasme des cellules végétales du cortex des racines où elles se prolifèrent rapidement, elles prennent des formes plus ou moins globuleuses, parfois branchées devenant ainsi des bactéroïdes. Les bactéroïdes sont enfermées par une membrane de type plasmique dérivant de la cellule végétale et forment ainsi un ensemble nommé Symbiosome. Le nombre de ces bactéroïdes dans une seule cellule infectée peut aller jusqu'à plusieurs milliers d'unité (Figure 7 et 8) (Schneider et Huyghe, 2015).

Tout en ayant un état physiologique différent de celui des rhizobia libres, les bactéroïdes transforment l'azote atmosphérique en ammonium qui sera mis à la disposition de la

légumineuse, en contrepartie la plante fournit à ces bactéries des dicarboxylates et d'autres nutriments comme source de carbone.

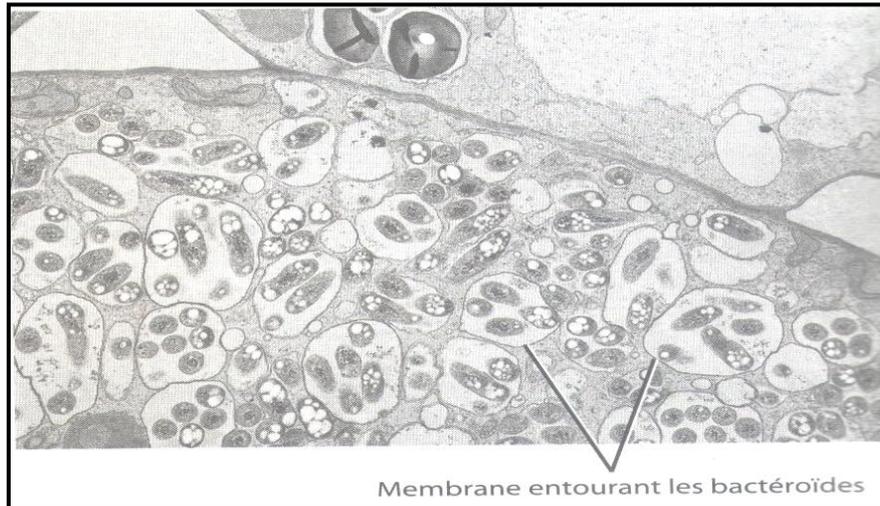


Figure 7 : Photomicrographie électronique de groupe des bactéroïdes, Entouré chacun d'une membrane dérivée de la cellule racinaire infectée (Raven *et al.*, 2014).

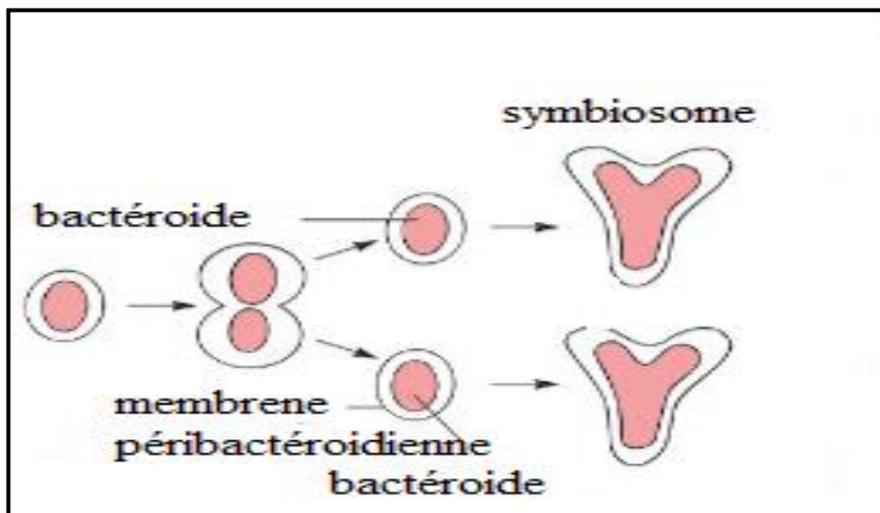


Figure 8 : La formation des bactéroïdes, entourés d'une membrane pér bactéroidienne forme et s'agrandissent de 7 à 10 fois leur volume, le symbiosome contient le bactéroïde fixateur d'azote, un espace pér bactéroidien, et la membrane pér bactéroidienne (Willey *et al.*, 2018).

Un nodule mature se compose de deux parties : les tissus internes constitués par les cellules infectées (Siege de la fixation de l'azote); et les tissus externes qui assurent les échanges avec la plante hôte et la protection des tissu internes (Selami, 2015).

Et suivant le type de légumineuse considéré, deux types de nodules peuvent être produits :

3.3.1 Nodules déterminés

Grâce à la présence d'un méristème persistant, ces nodules possèdent une forme cylindrique et allongée. A leur maturité, ils contiennent le gradient de zones suivant : le méristème est accompagné de zones d'infection et différenciation, de fixation de l'azote (Figure 9-a) (Raven *et al.*, 2014).

3.3.2 Nodules indéterminés

Ils sont d'une forme sphérique, à cause de l'absence d'un méristème permanent, et ne possèdent pas un gradient développemental évidant (Figure 9-b) (Raven *et al.*, 2014).

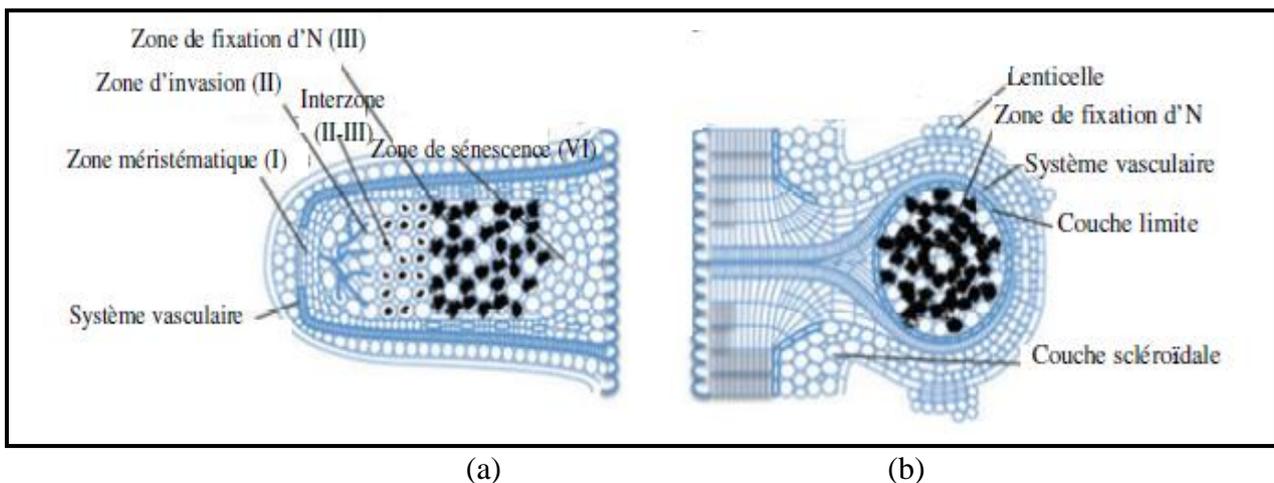


Figure 9 : Nodule mature fixateur d'azote (Ferguson *et al.*, 2010).
(a) Nodule à croissance indéterminé, (b) Nodule à croissance déterminé

4. Le dialogue moléculaire de l'interaction BNL-légumineuse

Comme mentionné précédemment, la symbiose BNL-légumineuse débute par une reconnaissance mutuelle entre la bactérie et la plante hôte résultante d'un dialogue moléculaire élaboré. C'est une étape très spécifique qui se déroule en deux phases :

La phase d'attraction : lorsque l'azote est disponible en quantité insuffisante dans le milieu, les racines des légumineuses émettent des flavonoïdes, qui attirent les rhizobactéries à proximité des poils absorbants jeunes (Suty, 2015).

La phase de reconnaissance : les flavonoïdes se lient à la protéine bactérienne NodD, qui agit comme un régulateur transcriptionnel et active la transcription des gènes *nod*, qui codent pour des enzymes biosynthétiques indispensables à la production d'un facteur Nod (Figure 10). Les facteurs Nod se lient aux récepteurs spécifiques présents au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires. La réception de message que constitue le facteur Nod, induit une succession de signaux cellulaires qui conduisent à l'élaboration des facteurs

transcriptionnels régulateurs de l'expression des gènes. Les produits de ces derniers induisant les modifications biochimiques et structurales des symbiontes, qui permettent le fonctionnement des nodules fixateurs d'azotes (Suty, 2015 ; Willey *et al.*, 2018).

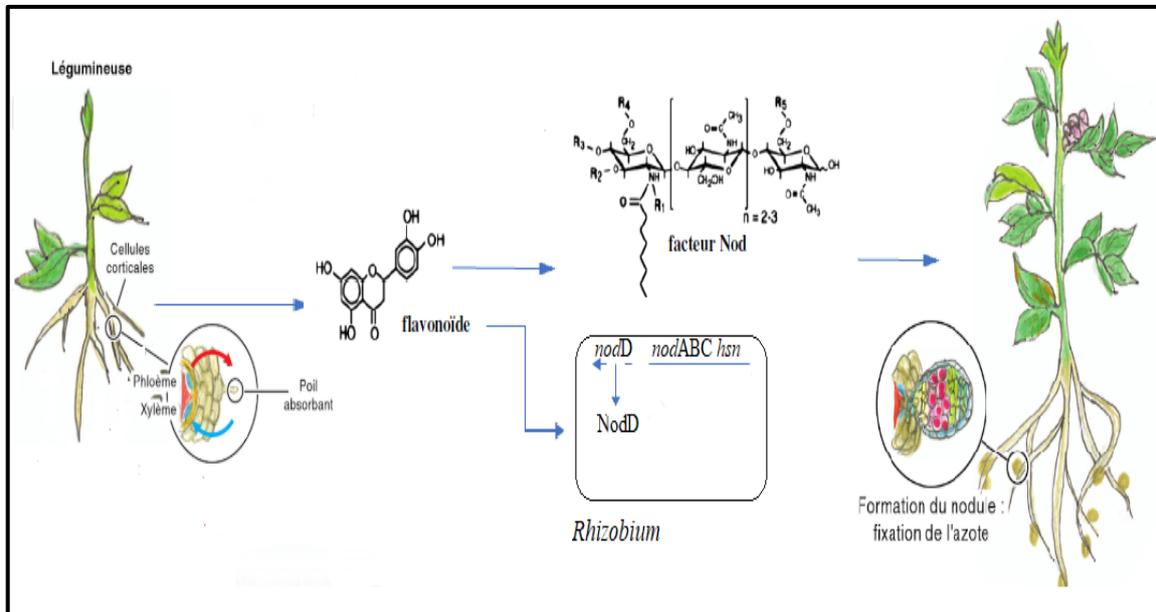


Figure 10 : Le dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuse (Suty, 2015 ; Lindström *et al.*, 2010).

4.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement considérés comme des composés phytochimiques indispensables, ils dérivent du métabolisme secondaire des plantes et sont émis dans la rhizosphère (Suty, 2015). Leur synthèse a lieu dans la plupart des organes des plantes (Taylor et Grotewold, 2005), et ont des rôles variés par exemple : en affectant plusieurs processus de développement chez la plante, en signalant également aux bactéries dans la rhizosphère pour induire les gènes *nod*...etc (Roba, 2016).

Leur structure hétérocyclique dépend de l'espèce végétale, ils sont regroupés en plusieurs classes suivant l'arrangement des cycles aromatiques qui les composent et des substitutions qu'ils portent, dont les isoflavones (composés phénoliques) qui sont caractéristiques des légumineuses, et qui sont retrouvés en grande quantité dans la graine de Soja (Schneider et Huyghe, 2015 ; Taylor et Grotewold, 2005).

4.2 Les facteurs Nod (ou NFs)

Les facteurs Nod, produits des gènes *nod*, sont des molécules symbiotiques de nature lipochitoooligosaccharidiques (LCOs) constituées d'un squelette de chitine, c'est-à-dire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons β -1,4 dont le nombre

est compris entre trois et cinq unités (Figure 11). Les facteurs Nod diffèrent pour chaque espèce bactérienne par au moins un groupement hydrogène, acyle, méthyle ou sulfate. Ces substitutions chimiques particulières expliquent la spécificité des interactions entre la bactérie et la plante hôte (Suty, 2015 ; Denarié *et al.*, 2014).

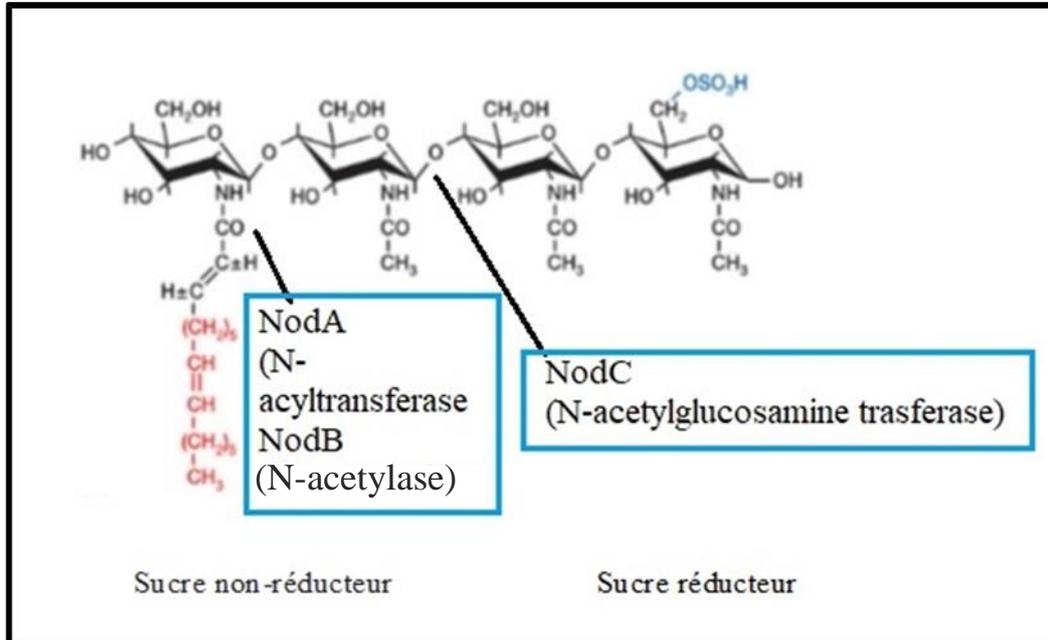


Figure 11 : Structure chimique d'un facteur Nod de *Sinorhizobium meliloti*. (Wais *et al.*, 2000).

Les enzymes responsables de la production des NFs sont indiqués (enzymes communs à toutes les bactéries et il existe d'autres enzymes responsables de décorations spécifiques des NFs de *S. meliloti* sont non indiqués) et leur activité enzymatique entre parenthèses

5. La génétique de la fixation symbiotique d'azote

De ce qui précède, la fixation symbiotique de l'azote implique des relations très complexes entre les BNL et la plante hôte. Le passage vers un métabolisme de fixation lors d'une invasion suivie du développement d'un nodule, consiste des changements importants de l'expression génétique des organismes qui y sont impliqués (William et Hopkins, 2003).

Au moins trois groupes de gènes sont impliqués dans le processus symbiotique. Il s'agit des gènes *nod* nécessaires à la nodulation, des gènes *nif* codant pour la nitrogénase et des gènes *fix* indispensables pour la fixation de l'azote (Kouakou, 2011).

5.1 Les gènes *nod* et leur localisation

Les gènes de nodulation ou gènes *nod* codent pour des enzymes nécessaires à la voie de biosynthèse des facteurs Nod, ils incluent les gènes *nod* communs, les gènes *nod* régulateurs et les gènes *nod* spécifiques (Skorupska *et al.*, 2010). Ce groupe de gènes est activé avant l'infection de la racine et lors des premiers stades de nodulation. Il se peut se localiser soit sur

un plasmide bactérien dit : **Plasmide Sym** (sym pour symbiose) (William et Hopkins, 2003), ou sur un chromosome en « îlot symbiotique » (Kaneko *et al.*, 2002).

5.2 Les gènes *nod* régulateurs

Comprenant notamment le gène *nod D* qui semble jouer un rôle central. En présence des exsudats racinaires (les flavonoïdes), le produit de ce gène dit NodD active la transcription de groupe *nod* Communs (*nod A*, *nod B*, *nod C*) ainsi qu'une série des gènes de spécificité de l'hôte (Figure 10) (William et Hopkins, 2003).

5.2.1 Les gènes *nod* communs

Les trois (03) gènes *nod* (*nod A*, *nod B*, *nod C*), appelés aussi gènes structuraux, sont des gènes de nodulation communs à tous les rhizobiums y compris les β -protéobactéries. Ils codent pour le squelette chitino-oligosaccharidique des facteurs Nod, d'où leur rôle est essentiel à la formation des nodosités (Figure 11) (William et Hopkins, 2003). Cependant, en 2007, une surprise exceptionnelle ait lieu, lorsque Giraud et ses collaborateurs analysent le génome des deux (02) souches BTAi1 et ORS278 de *Bradyrhizobium* photosynthétiques nodulant *Aeschynomene sensitiva* et découvrent l'absence des gènes *nod* communs dans leur génome. Cette symbiose, ne faisant apparemment pas intervenir de facteurs Nod, est appelée Nod-indépendante (Giraud *et al.*, 2007 ; Bonaldi *et al.*, 2011).

5.2.2 Les gènes *nod* spécifiques hsn « host specific nodulation »

Ces gènes assurent les diverses substitutions qui modifient le squelette de base des facteurs Nod et jouent un rôle important dans la spécificité des interactions (William et Hopkins, 2003).

5.3 Les gènes *nif* et les gènes *fix* :

Dans les étapes tardives du développement des nodules, les gènes *nif* et les gènes *fix* sont activés (William et Hopkins, 2003). Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, essentiels à la fixation d'azote et qui sont rencontrés uniquement chez les fixateurs symbiotiques (William et Hopkins, 2003 ; Kouakou, 2011). Les gènes *nif* sont impliqués dans la biosynthèse du complexe enzymatique, **la Nitrogénase**, qui catalyse la réduction de l'azote. On retrouve parmi eux les gènes de structure *nifH*, *nifD* et *nifK*. La nitrogénase est constituée de deux sous-unités fonctionnelles : **La Dinitrogénase réductase** (protéine Fe) codée par le gène *nifH*, est

composée de deux chaînes identiques et la **Dinitrogénase** (protéine Mo-Fe) qui est un hétérotétramère, codé par les gènes *nifD* et *nifK* (Figure 12) (Ott *et al.*, 2005).

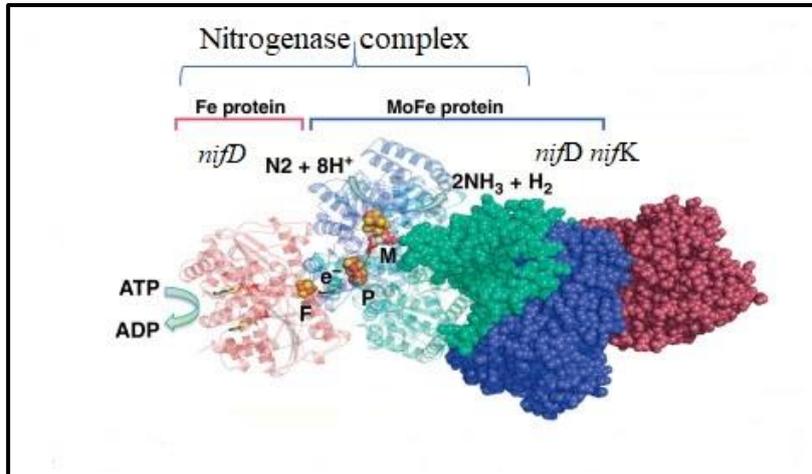


Figure 12 : Structure de la nitrogénase et les gènes nécessaires à sa biosynthèse (Giles, 2014).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1. Isolement des bactéries nodulant le Fenugrec (*Trigonella gladiata* Stev.)

1.1. Description de la zone d'étude

Notre travail porte sur les nodules racinaires de la plante *Trigonella gladiata* Stev. poussant dans la région de Trachet, commune d'El Mahmel à la Wilaya de Khenchela, dont les coordonnées GPS de latitude et de longitude sont respectivement les suivantes : 35.15502°N 7.28839°E (Figure 13).

En général le climat est de type continental au Nord et presque saharien au Sud. Les Hivers, sont très rigoureux et les étés chauds et secs. Durant l'été, à Khenchela, les pluies sont moins importantes qu'elles ne le sont en hiver. La température moyenne à Khenchela est de 12,6 °C, tandis que les précipitations annuelles moyennes sont de 446 mm. (ANDI, 2015 et climate-data.org)

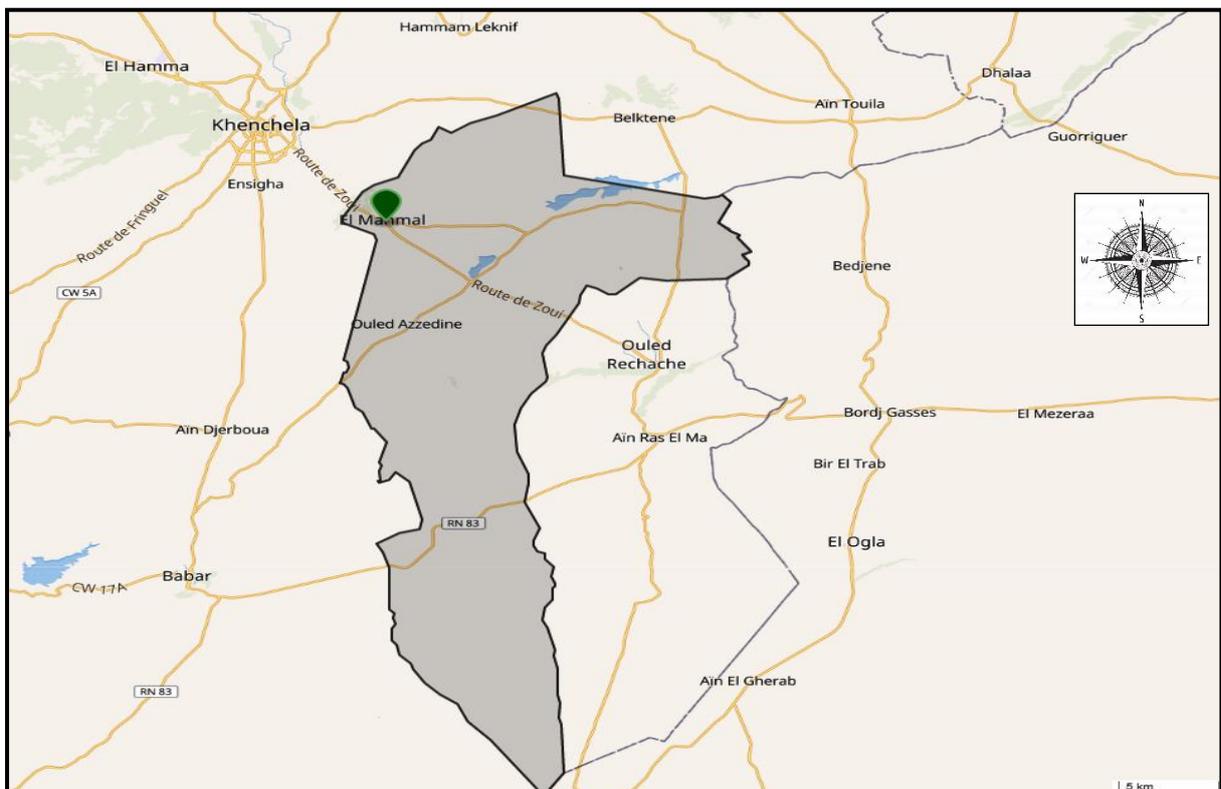


Figure 13 : Géolocalisation de la région du prélèvement (wikipedia.com).

1.2. Collecte des nodules

On considère que la saison printanière est la meilleure période pour effectuer la sélection et l'échantillonnage des nodules, notamment, celle allant du mois de Mars jusqu'au mois d'Avril, où, en plus de l'activité optimale de la plante, la terre est sèche et praticable d'une part, et les nodosités racinaires sont bien distinctes avec leur couleur rougeâtre témoignant de la présence de la leghémoglobine d'une autre part.

Selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), la collecte est réalisée en creusant environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol à fin d'extraire la plante et son appareil racinaire (Figure 14-a). En se servant des mains, les racines sont dégagées de la terre mais sans la détérioration des nodules (Figure 14-b).

Ensuite, les racines sont coupées et transportées dans des sacs en plastique immédiatement au laboratoire.

Au laboratoire, on procède au lavage minutieux des nodules à l'eau courante, puis à leur détachement à l'aide d'un couteau 1 à 2 mm du site d'attache. Après, les nodosités sont séchées avec du papier filtre et conservées.



Figure 14 : Collecte des nodules (photo D.P. Beck *et al.*, 1993).
(a) : Collecte des nodules ; (b) : Rinçage des racines et nodules.

1.3. Conservation des nodules

Pour une courte durée de stockage et pour un usage immédiat, les nodules frais sont séchés au papier filtre puis réservés directement au réfrigérateur à une température de 4 °C pour une durée de 24 jusqu'à 48 heures (leur congélation est prohibée à cause de l'effet destructif des cristaux de glace). Cependant, pour une longue conservation allant de 06 à 12 mois, on recommande l'emploi du Chlorure de Calcium (CaCl_2) autant que dessiccateur (Absorbe l'humidité) (Vincent, 1970). Pour la dite conservation, ce dernier remplira la moitié du flacon utilisé puis recouvert d'un bout de coton sur lequel les nodules seront déposés. Selon Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), la mention du nom de la plante, la date et le lieu de collecte ainsi que la date de conservation est obligatoire sur chaque flacon (Figure 15).

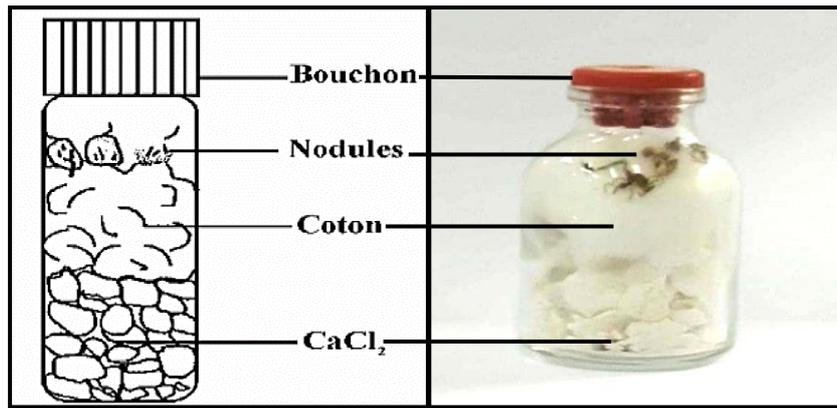


Figure 15 : Conservation des nodules.

1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules

Si la conservation des nodules est effectuée avec un dessiccateur, ils sont préalablement mis dans de l'eau distillée pendant 24 heures à une température de 4 °C (au réfrigérateur), ensuite pour une heure à une température ambiante, cette étape consiste à réhydrater les nodosités. Si non, ils sont directement utilisés après le lavage.

Afin d'isoler les bactéries que contiennent les nodosités, un protocole décrit par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) est exécuté. Il comportera les étapes suivantes :

1.4.1. Stérilisation de nodules

Sous la hotte à flux laminaire «STERIL BIO BAN modèle 48 » (Figure 16), les nodules préparés sont immergés dans l'éthanol 95 % pendant dix secondes, puis transférés immédiatement dans une solution de l'hypochlorite de sodium 3% (NaClO 3%) pendant trois minutes. Ensuite, ils sont rincés 10 fois dans de l'eau distillée stérile et sont laissés prendre du volume après le 10^{ème} rinçage (Vincent, 1970).

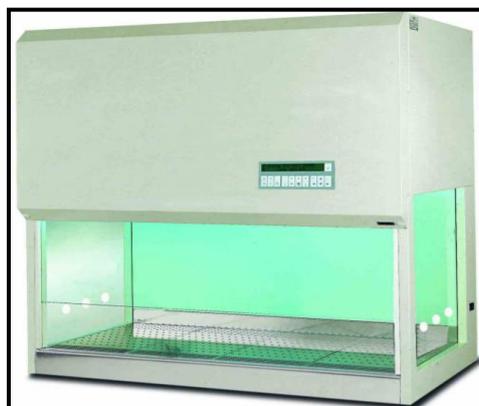


Figure 16 : Hotte à flux laminaire « STERIL BIO BAN modèle 48 ».

1.4.2. Test de stérilisation

Ce test est effectué pour confirmer la stérilisation externe des nodules et vérifier l'efficacité de la technique adoptée, l'ensemencement est réalisé en faisant passer un nodule stérile sur le milieu YMA additionné de rouge Congo (Annexe 01), puis l'incuber à 28 °C pendant 24 heures.

1.4.3. Ecrasement des nodules

Dans des conditions d'asepsie totale (sous la hotte à flux laminaire) et sur une boîte de Petri stérile, les nodules stériles sont déposés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile, où ils seront écrasés à l'aide d'une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen (Vincent, 1970).

1.4.4. Isolement des bactéries

Après l'écrasement des nodosités et l'obtention d'un jus trouble, ce dernier est étalé à l'aide d'une anse de platine, sur une boîte de Petri contenant le milieu spécifique YMA (yeast mannitol agar) additionné de rouge Congo (Vincent, 1970). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (Somasegaran et Hoben, 1994) (Figure 17) dans le but d'avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les mêmes nodules sont ensemencés sur le milieu glucose peptone agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA + BCP). Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C pendant 48 à 72 heures.

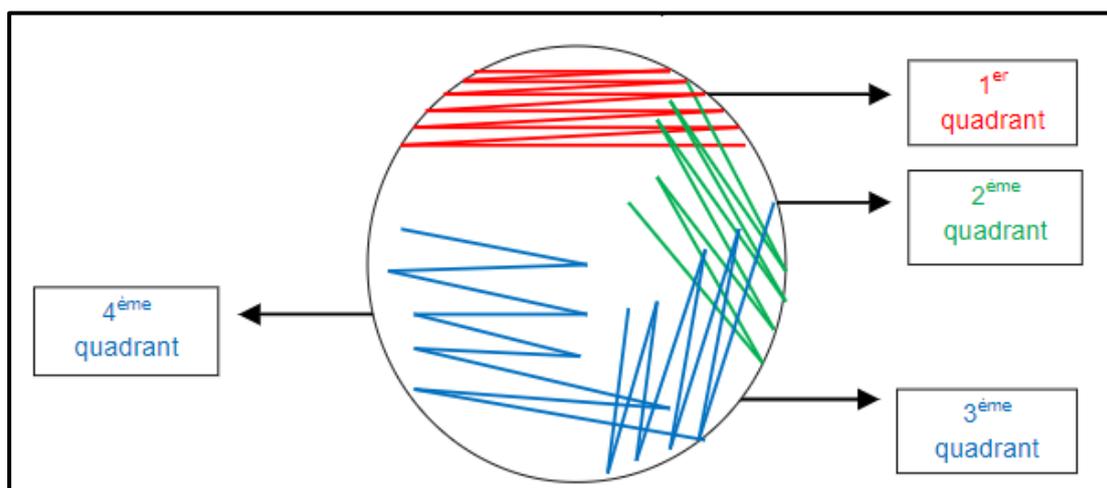


Figure 17 : Ensemencement par la technique des cadrans (Somasegaran et Hoben, 1994).

2. Caractères cultureux

2.1. Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (Annexe 01).

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

- Milieu liquide: YMB (Yeast Mannitol Broth)

- Milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

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

2.2. Purification des isolats

Selon les critères de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), La description des isolats implique ce qui suit : Forme, aspect et couleur des colonies sur les différents milieux. La purification nécessite des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes.

La technique consiste, dans une première étape, àensemencer des tubes qui contiennent le bouillon YMB, puis les incuber pendant 24 h dans un bain-marie à 28 °C et sous agitation (120 tours/ min). Dans une seconde phase et après l'incubation, les tubes présentant un trouble (témoignent d'une croissance), feront l'objet d'un deuxième ensemencement sur le milieu YMA+ RC (Annexe 01), Après lequel des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique seront enfin réalisés jusqu'à l'obtention des isolats purs.

2.3. L'examen visuel des colonies

Cet examen consiste à décrire l'aspect macroscopique des colonies obtenues sur les milieux YMA, YMA+RC et GPA + BCP.

2.4. Test de la vitesse de croissance

Cet examen consiste à cultiver nos isolats sur le milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB), qu'on incube à 28 °C pendant cinq jours durant lesquels, une lecture quotidienne est effectuée à fin d'observer et noter tout virage de couleur de milieu.

2.5. Conservation des isolats

La conservation des isolats est précédée par un enrichissement des cultures en milieu liquide tel que le YMB, l'incubation se fait à 28 °C sous agitation pendant 24 heures dans un bain marie.

Plusieurs techniques de conservation sont possibles, dans le cadre du présent travail, on a utilisé la méthode suivante :

La conservation est réalisée sur le milieu YMA additionné de 03 g/l de CaCO₃ ayant le rôle d'agent neutralisant l'acidité. Le milieu autoclavé est répartie dans des tubes à essai formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle et à l'aide d'une anse de platine, des stries régulières sont effectuées à la surface de la gélose. Suite à une incubation à 28 °C pendant trois jours, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4 °C, ce qui permet une longue durée de conservation allant de six à douze mois (Vincent, 1970).

2.6. Examen microscopique après coloration de Gram

La coloration de Gram est d'un pouvoir discriminant trop élevé, dû à l'exploitation des propriétés biochimiques de la paroi bactérienne. Grace à cette technique, les bactéries sont distinguées en deux grands groupes : les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (Annexe 02). Il est important de noter, que la coloration de Gram est aussi employée lors de la vérification de la pureté des cultures.

3. Caractéristiques phénotypique des isolats

3.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques)

Notre objectif est de mettre en évidence des enzymes suivantes synthétisées par les bactéries à l'exemple de la nitrate-réductase, l'uréase, la cellulase, la catalase et l'oxydase.

3.1.1. Réduction des nitrates

Afin de mettre en évidence la présence de cette enzyme, le bouillon Tryptone Yeast (TY) (Annexe 01) additionné de 0,1% de KNO₃ (p/v) estensemencé avec les différents isolats étudiés, puis incubé pendant quatre jours à 28 °C sous agitation au bain marie à une vitesse égale à 120 tours/min. Après incubation, la révélation est faite, dans un premier temps, par addition de quelques gouttes des deux réactifs nitrate-réductase I et II. Une réaction positive due à la réduction des nitrates en nitrites est démontrée par l'apparition d'une couleur rouge. Cependant une observation négative nécessitera l'addition d'une pincée de poudre de zinc qui

en présence de nitrates donnera une couleur rouge, tandis qu'en leur absence, le milieu reste incolore.

3.1.2. Hydrolyse de l'urée

L'enzyme recherchée est dite « Uréase », elle catalyse l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et d'ammonium (William et Hopkins, 2003). Ce dernier responsable de l'alcalinisation de milieu.

Pour sa mise en évidence, les isolats sont cultivés à 28 °C pendant 72 heures sur le milieu YMA (Annexe 01) auquel, il est rajouté 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de Rouge de Phénol comme indicateur de pH, qui en cas de réaction positive, il vire vers le rose Indigo. A cause de sa thermolabilité, la solution d'urée est stérilisée sous hotte à flux laminaire par filtration (filtre 0,22µm), puis elle sera incorporée au milieu YMA autoclavé (à 120 °C pendant 20 minutes) et maintenu à 45 °C.

3.1.3. Activité cellulolytique :

Les isolats sont mis en culture sur milieu YMA auquel il a été rajouté préalablement le CMC (Carboxy Methyl Cellulose) à une concentration égale à 0,25%, puis incubés à 28 °C pendant cinq jours. Après cette période, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et ré-incubées pendant 30 minutes à 28 °C. Ensuite, la solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1M ; les boîtes sont laissées pendant 30 minutes à température ambiante puis vidées.

Sur un fond rouge, les colonies apparentes avec un halo jaune orangé, mettent en évidence l'activité endoglucanasique.

3.1.4. Recherche de l'oxydase

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'un cytochrome oxydase qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. La mise en évidence de cette enzyme est effectuée comme suit :

A l'aide de pinces, un disque d'oxydase imprégné du réactif N,N,N',N'-Tétraméthyl-p-phénylenediamine dihydrochloride (incolore) est placé sur une lame porte objet. Puis une colonie représentative de la culture fraîche à tester est choisie et prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Selon les recommandations fournies avec les disques Oxydase (BIORAD), il est strictement interdit d'utiliser une anse de métal (à l'exception du platine) cela peut provoquer des réactions faussement positives.

Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration dans un délai de 30 secondes. Une réaction positive est signalée par une coloration bleu foncé à violet, tandis que la réaction négative est révélée par une absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes.

3.1.5. Recherche de catalase

Une quantité suffisante de culture est prélevée et elle est mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. En présence des bactéries productrice d'une catalase, on observe immédiatement à partir d' H_2O_2 10 V une apparition de bulles, un dégagement gazeux de dioxygène, ce qui traduit une réaction positive et le contraire est valable.

3.2. Tests physiologiques (influence des facteurs abiotiques)

Certaines conditions environnementales peuvent affecter la population bactérienne dans le sol. Parmi celles-ci, ils figurent le pH (acidité et alcalinité), la température (influence profondément la multiplication et le métabolisme bactérien), le stress salin.

3.2.1. Effet de pH

Nos isolats sont cultivés sur le milieu TY (Annexe 01) ajusté à des différents pH : 4,0 ; 5,0 ; 6,8 ; 8,0 et 10,0 ; en inoculant chaque tube par une öse de chaque isolat à l'exception des tubes destinés à être utilisé comme blancs. Puis incubés à 28 °C sous agitation au bain marie à une vitesse égale à 120 tours/min. L'évaluation de la croissance est effectuée par une mesure photométrique de la densité optique (DO) à une longueur d'onde 600 nm après 72 heures d'incubation, en utilisant le spectrophotomètre « SHIMADZU model UV-1800 ».

3.2.2. Effet de la température

Afin de déterminer les températures optimales et maximales de croissance, les isolats sont ensemencés sur le milieu YMA (Annexe 01) par la méthode des stries simples puis incubées pendant 72 heures à températures différentes : 4 °C, 20 °C, 28 °C, 37 °C, 45 °C. Durant cette période, une lecture quotidienne des boites va permettre un meilleur suivi de la croissance. Pour la température 4 °C incubation peut aller jusqu'à cinq jours.

3.2.3. Effet du Chlorure de Sodium

Pour tester la tolérance de nos isolats au chlorure de sodium (NaCl), on ensemence le bouillon TY (Annexe 01) additionné de NaCl à des concentrations différentes : 1%, 2%, 3%, 5% et 10% (p/v) (correspondants respectivement à 171 mM, 342 mM, 513 mM, 855 mM, 1710

mM) par introduction dans chaque tube une öse de chaque isolat à l'exception des tubes servant comme blancs.

Les tubes sont incubés à 28 °C sous agitation au bain mari à une vitesse égale à 120 tours/min pendant 72 heures, puis soumis à une mesure photométrique de la densité optique (DO) à une longueur d'onde 600 nm afin d'estimer l'effet de la salinité sur la croissance de nos isolats, en utilisant le « SHIMADZU model UV-1800 ».

3.3. Tests nutritionnels

Ces tests vont mettre en évidence la capacité d'un isolat à utiliser les différents hydrates de carbone comme seule source de carbone ainsi que des acides aminés différents comme seule source d'azote.

3.3.1. Sources de carbone

Afin d'étudier leur capacité d'assimiler les sources de carbone, les isolats sont cultivés sur le milieu YMA (Annexe 01) où les glucides : D-Saccharose, D-Glucose, Maltose, D-Galactose et L-Arabinose, ont remplacé le mannitol avec une concentration de 1% (p/v). La quantité de l'extrait de levure est diminuée à 0,1 g/l (Somasogaran et Hoben, 1994). Les boites sontensemencées en surface par des stries et incubées à 28 °C pendant cinq jours avec une lecture quotidienne des boites permettant ainsi un meilleur suivi de la croissance.

3.3.2. Sources de l'azote

Les isolats sont cultivés sur le milieu Defini8 modifié (Vincent, 1970) (Annexe 01) où le glutamate de sodium est substitué par un des acides aminés suivants : Alanine, Asparagine, Méthionine, Tyrosine et Valine à une concentration de 0,1%. Les boites sontensemencées en surface par des stries simples puis incubées pendant cinq jours à 28 °C.

Chapitre 3

Résultats et Discussion

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

➤ Test de stérilisation

Après la durée d'incubation préconisée, le test est considéré négatif suite à l'absence de toute croissance sur le milieu YMA+RC. Ceci témoigne de l'efficacité de la méthode utilisée lors de la stérilisation des nodules.

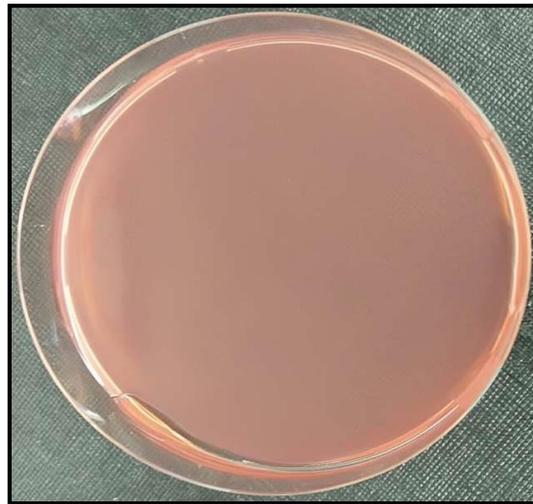


Figure 18 : Résultat du test de stérilisation.

2. Caractères cultureux

2.1. Purification des isolats

Après la culture des extraits des différents nodules, on est parvenue à isoler et à purifier onze isolats puisqu'ils répondent à la description des *Rhizobium* établie par Vincent (1970) et Jordan (1984) en absorbant peu le rouge Congo. Les isolats pris en comptes codés comme suit : Tw1, Tw3, Tw4, Tw5, Tw6, Tw8, Tw9, 2(N1), 3(N3), 4(N3) et 5(N4) ont fait l'objet d'un test de Gram par coloration pour confirmer la pureté des cultures.

2.2. L'examen visuel des colonies

2.2.1. Croissance sur milieu YMA

Après deux jours d'incubation à 28 °C sur le milieu YMA (yeast mannitol Agar), Les colonies présentent un contour régulier, une forme circulaire mesurant entre 2 et 5 mm, de couleur blanche translucide, avec aspect lisse muqueux dû à la production des « Exopolysaccharides » (EPS) (Figure 19) (Jordan, 1984).



Figure 19 : Aspect visqueux des isolats sur YMA.

2.2.2. Croissance sur milieu YMA + rouge Congo

La croissance des isolats était observée clairement au bout des premières 48 heures après inoculation, ou on a noté des colonies visqueuses, de couleur rose claire. Selon les travaux de Vincent (1970), la plupart des contaminants absorbent fortement le rouge Congo, tandis que la couleur rose claire est caractéristique des *Rhizobium*, faisant ainsi le principal critère dans le choix des colonies à étudier comme le montre la figure 20.



Figure 20 : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur YMA+RC.

2.2.3. Croissance sur milieu GPA + BCP

Étant donné que le pourpre de bromocrésolé est un indicateur de pH, il est employé à fin de déterminer la variation du pH du milieu GPA. En présence de croissance, sa couleur varie vers le jaune dans le cas d'une acidifiante et vers le violet foncé lors d'une alcalisation.

Après incubation et au bout des 72 heures, neuf isolats ont montré une bonne croissance avec acidification (couleur jaune), ceci met en évidence leur capacité à assimiler le glucose comme source de carbone, ce qui est en accord avec les travaux de Singh et son équipe publiés en 2008 portant sur l'isolement des *Rhizobium* nodulant la *Trigonella foenum-graecum*. Cependant deux d'entre eux [2(N1) et Tw9] ont présenté une alcalisation du milieu (Figure 21).

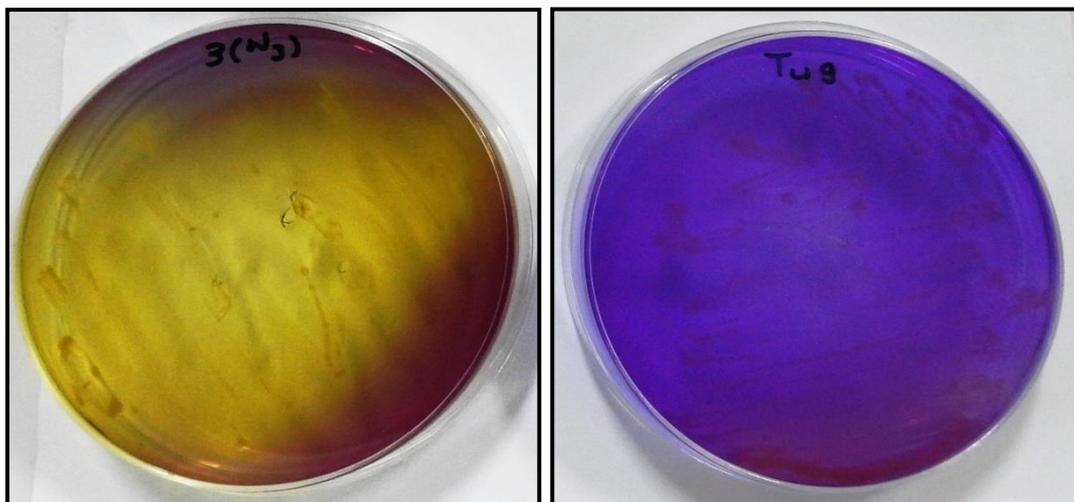


Figure 21 : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur GPA + BCP.

2.3. Test de la vitesse de croissance

En fait, le bleu de bromothymol (BTB) est un indicateur coloré permettant la mise en évidence d'une réaction acide ou basique dans une gamme de pH variant entre 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le virage de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue.

A travers ce test, Les bactéries nodulant les légumineuses, notamment les rhizobia, sont classées selon leur type ou vitesse de croissance en deux clamps : celui des bactéries à croissance lente (à l'exemple du genre *Bradyrhizobium*) et celui des bactéries à croissance rapide (comme les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, ...) (Jordan, 1984 et Pagano, 2008).

Sur le milieu YMA+ BTB et au bout de 72 heures d'incubation à 28°C, la totalité de nos isolats a présenté une coloration jaune, qui est due à une acidification totale du milieu de culture (Figure 22). Cela signifie que la croissance des différents isolats est rapide. Des résultats similaires ont été rapportés par Jordan (1982), où la croissance lente de quelques souches de *Rhizobium* était à l'origine de leur transfert vers un nouveau genre dit *Bradyrhizobium*.

Xu *et al.* (1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YEM + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.

Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été détectées (Moreira *et al.*, 1993). De même, des souches à croissance rapide alcalinisant le milieu ont été mises en évidence par Hernandez et Focht (1984).

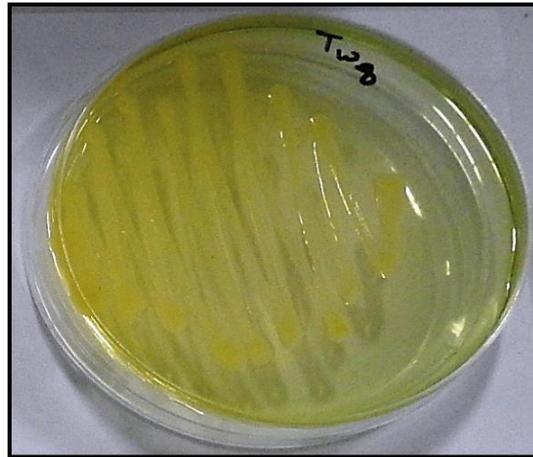


Figure 22 : Résultat du test de vitesse de croissance YMA+BTB.

2.4. Examen microscopique après coloration de Gram

La coloration de Gram a révélé que tous nos isolats sont des coccobacilles courts, à Gram négatif et non sporulants. Ce qui corrobore la description des bactéries du sol établie par Jordan (1984) (Figure 23), qui rapporte qu'il s'agit de bacilles à Gram négatif, strictement aérobies et non sporulants, leur taille varie entre 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur, mobiles avec une flagellation polaire, subpolaire ou péritriche composée de 02 à 06 flagelles (Werner, 1992).



Figure 23 : Résultat de la coloration de Gram de l'isolat Tw9 (Objectif x100).

3. Caractéristiques phénotypique des isolats

3.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques)

3.1.1. Réduction des nitrates

Dans notre étude et après la première étape de la lecture (Ajout des réactifs de Griess), deux isolats [Tw8 et 2(N₁)] ont présenté une coloration rose, ce qui signifie qu'ils possèdent l'enzyme (Nitrate réductase NR+) et qu'ils ont réduit les nitrates en nitrites (Figure 24-a). Cependant et dans une seconde étape, les huit isolats n'ayant montré aucun changement de couleur, ont fait l'objet d'ajout de poudre de zinc où quatre d'entre eux sont restés incolores, ce qui témoigne de la réduction des nitrates jusqu'au stade azote gazeux en passant par le stade des nitrates, ce processus est dit dénitrification.



Pour le reste des isolats, l'apparition d'une coloration rose (Figure 24-b) met en évidence la réduction des nitrates en nitrites via à la poudre de zinc, et donc ces isolats sont dépourvus de l'enzyme nitrates réductase (NR-).

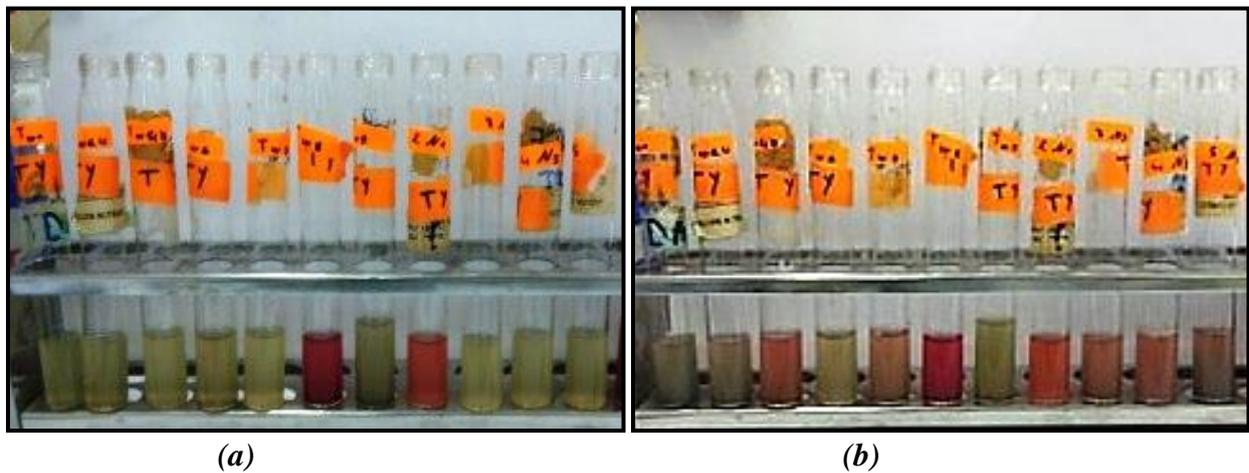
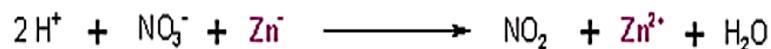


Figure 24 : Résultat du test de la Nitrate-réductase.

(a) Résultats avant l'ajout du Zinc en poudre, (b) Résultats après ajout du Zinc en poudre.

Une telle variabilité de résultats a été notée chez différents rhizobia. Beaucoup de travaux ont confirmé l'effet négatif des nitrates sur la mise en place des nodosités induites par les bactéries appartenant au genre *Rhizobium*, notamment, ceux établis par Munns (1968) qui ont confirmé que la présence des nitrates dans le sol réduit la capacité d'adsorption des rhizobia. Alors que chez certaines souches du même genre, les nitrates n'affectent pas négativement ce

processus. De plus, les études menées sur des souches différentes de *Bradyrhizobium* ont prouvé que les souches dotées cette enzyme (NR+), sont capables d'infecter suffisamment les racines, même à des concentrations relativement élevées en nitrate, alors que chez les souches qui en sont dépourvues (NR-) cette propriété est complètement perdue (Luciński *et al.*, 2002).

Il a été rapporté aussi, que l'activité nitrate réductase du model symbiotique *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium meliloti* est indispensable au maintien d'un état énergétique élevé dans le nodule permettant la fixation d'azote en présence réduit d'oxygène (Horchani *et al.*, 2011).

3.1.2. Hydrolyse de l'urée

L'activité uréase est positive pour tous les isolats (Figure 25). Chez les rhizobia, elle a été mise en évidence initialement par Jarvis *et al.* (1977) en utilisant le rouge de Phénol comme indicateur de pH. Ce dernier change de couleur vers le rose Indigo suite à une activité hydrolytique de l'urée « $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ » dont le produit est l'ammonium (NH_3), ce dernier provoque une augmentation de pH (alcalinisation du milieu) selon la réaction suivante :



D'un côté, cette propriété bactérienne joue également un rôle important dans assimilation des composés azotés issu de l'environnement et des engrais à base d'urée dans le monde agricole (Mobley, 1992) et d'un autre côté, cette enzyme constitue un système de défense et de survie contre le stress acide auquel les bactéries peuvent faire face dans les différents environnements (Cotter *et Hill*, 2003).

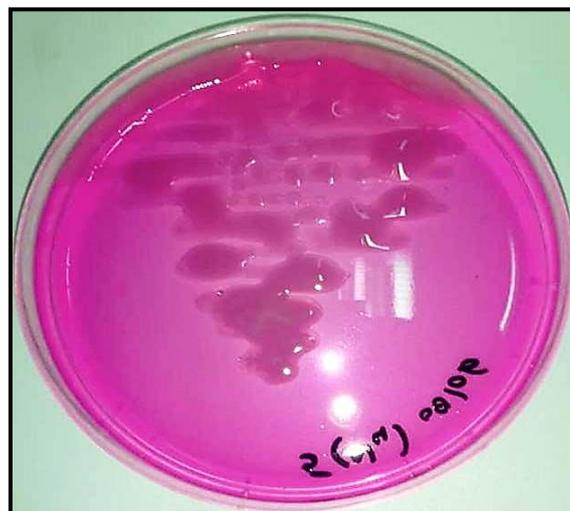


Figure 25 : Résultat de l'hydrolyse de l'urée chez l'isolat 5(N4).

3.1.3. Activité cellulolytique

L'apparition de colonies sur un fond rouge avec un halo jaune orangé, prouve la présence d'une endo β 1-4 glucanase, mise en évidence par hydrolyse du carboxyméthyl cellulose (CMC) suite à l'addition de NaCl et après rinçage (Lindeström et Lehtomak, 1988).

Tous les isolats ont montré une réaction positive (Figure 26). Ils sont donc capables d'hydrolyser le CMC. Cette enzyme est considérée comme une enzyme clé que les bactéries utilisent afin de décomposer la paroi du poil racinaire des plantes lors de l'établissement de la symbiose.

A côté de l'activité pectinolytique, l'activité cellulolytique a été détectée principalement chez *Rhizobium sp.*, *R. leguminosarum*, *Azorhizobium caulinodans*, et des souches de *Bradyrhizobium*, mais sans qu'il y ait une évidente relation entre leur activité et leur intervention lors des premiers stades de l'infection (Geelen *et al.*, 1995 ; Jimenez-Zurdo *et al.*, 1996a ; Mateos *et al.*, 1992). Ceci est en désaccord avec les suggestions de Mateos *et al.*, (2001), disant qu'une fonction complémentaire des enzymes hydrolytiques liées aux cellules rhizobiales existe dans l'infection initiale de l'hôte.

Il a été rapporté aussi, chez *Azorhizobium caulinodans* ORSS71, que le manque d'expression de l'endoglucanase n'a aucun effet sur son infection et le processus de nodulation (Geelen *et al.*, 1995).

En outre, une activité polygalacturonase au cours de l'association symbiotique entre *Medicago sativa* et *Rhizobium meliloti* a été détectée dans la plante (Michaud *et al.*, 2002).



Figure 26 : Résultat de l'hydrolyse du CMC.

3.1.4. Recherche de l'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome, l'enzyme de la bactérie oxyde le réactif réactif N,N,N',N'-Tetraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride pour former un composé violet, l'indophénol (Bibirou,2016).

Le transport d'électrons terminaux est généralement fait vers O₂ via une variété de systèmes à base de cytochrome. Certaines souches peuvent utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons terminal et obtenir une croissance anaérobie limitée (Howieson *et al.*, 2016).

L'activité oxydase est positive pour la majorité des isolats suite à l'observation d'une teinte bleue foncée immédiate (Figure 27), cela indique qu'ils possèdent cette enzyme. Par contre chez les isolats Tw1 et Tw5, les disques oxydase sont restés incolores c'est-à-dire le test est négatif.

Il est important de noter que le cytochrome oxydase, dans les symbioses fixatrices d'azote, est codé par les gènes *fix N*, *Q*, *O* et *P* (Crossman, 2004).

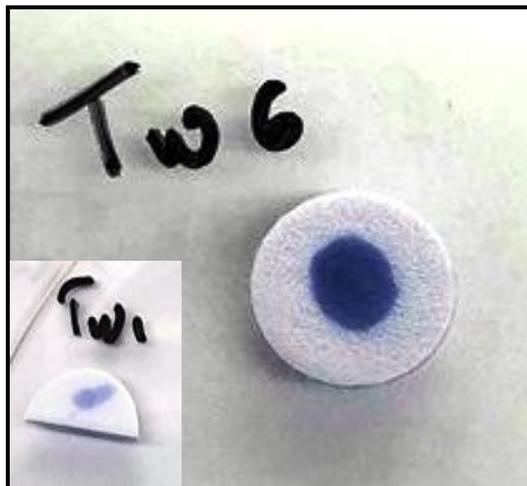


Figure 27 : Résultat du test Oxydase⁻ (Tw1) / Oxydase⁺ (Tw6).

3.1.5. Recherche de catalase

Ce test a permis de mettre en évidence la présence de la catalase, qui est une enzyme catalysant la libération d'oxygène du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Certaines bactéries et notamment les aérobies strictes en sont dotées.



Lors de la mise en contact avec le H₂O₂, l'isolat Tw3 a donné un résultat positif traduit par un dégagement des bulles d'air sur la lame, ce qui signifie qu'il possède cette enzyme (Catalase +) (Figure 28). Sachant que le contraire est vrai, c'est-à-dire que l'absence de catalase

est indiquée par une production nulle de bulles d'O₂. De ce fait, on considère que les autres isolats sont dépourvus de cette enzyme (Catalase -).

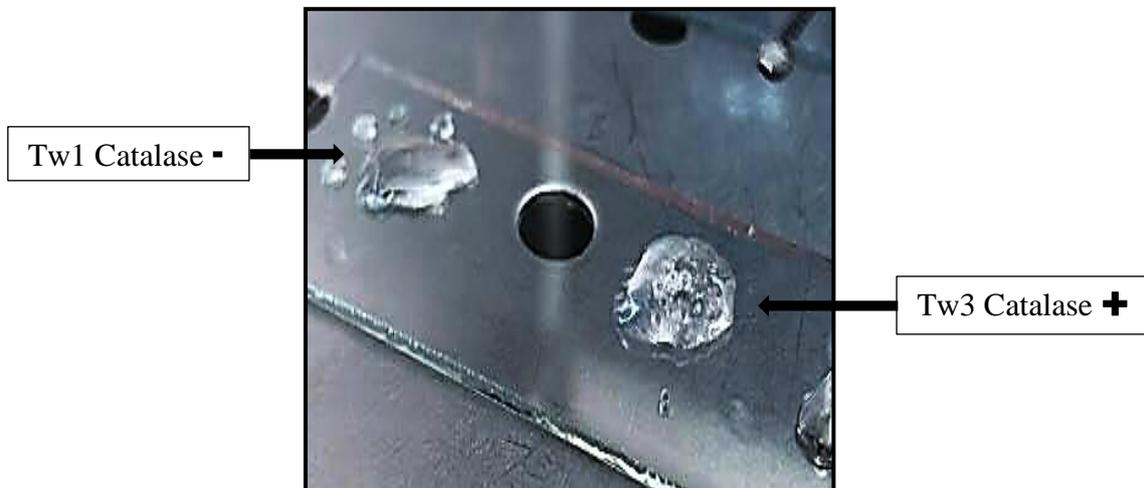


Figure 28 : Résultat du test Catalase.

3.2. Tests physiologiques (influence des facteurs abiotiques)

3.2.1. Effet du pH

L'acidité du sol est un paramètre qui influence la croissance et la survie des rhizobiums. Keyser et Munns (1979) considèrent que la fourchette de pH acide critique pour la croissance des rhizobiums se situe entre pH 4 et pH 6 (Hatimi *et al.*, 2013). Selon Jordan (1984) qui a montré que les bactéries de la famille des Rhizobiaceae peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9,0 en nodulant la légumineuse *Banara brasilensis* qui croît à un pH compris entre 4,0 et 6,0 et *Banara tropica* qui croît à un pH supérieur à 5,0 (Boddey, 2003).

A la lumière des différentes lectures de DO enregistrées, la représentation graphique (Figure 29) montre que tous les isolats testés sont capables de croître dans le milieu de culture TY à des pH supérieurs à 4,5 avec une variabilité de tolérance observée. Une croissance optimale exprimée en DO trop élevée a été observée chez la plupart des isolats au pH 6,8 (pH neutre), à l'exception de Tw3, Tw4 et Tw5 qui ont présenté une légère variation à travers l'évolution du pH avec un optimum de croissance au pH 5 (pH acide) ainsi qu'à pH 6,8 accompagné d'une tolérance du pH basique (pH 8).

Les isolats Tw1, Tw8 et Tw9 tolèrent les trois types de pH utilisés dans cette étude (acide, neutre et basique). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Raza *et al.* (2001) qui ont trouvé que les isolats étaient tolérants à des pH extrêmement alcalin et acide (pH de 4 à 10), ainsi qu'avec les conclusions de Maatallah *et al.* (2002) ayant enregistré la croissance de leurs isolats à des pH compris entre 4,0 et 7,5. La majorité des isolats a un optimum de

croissance au pH neutre (6,8). Leur croissance réduit avec l'augmentation ou la diminution de pH.

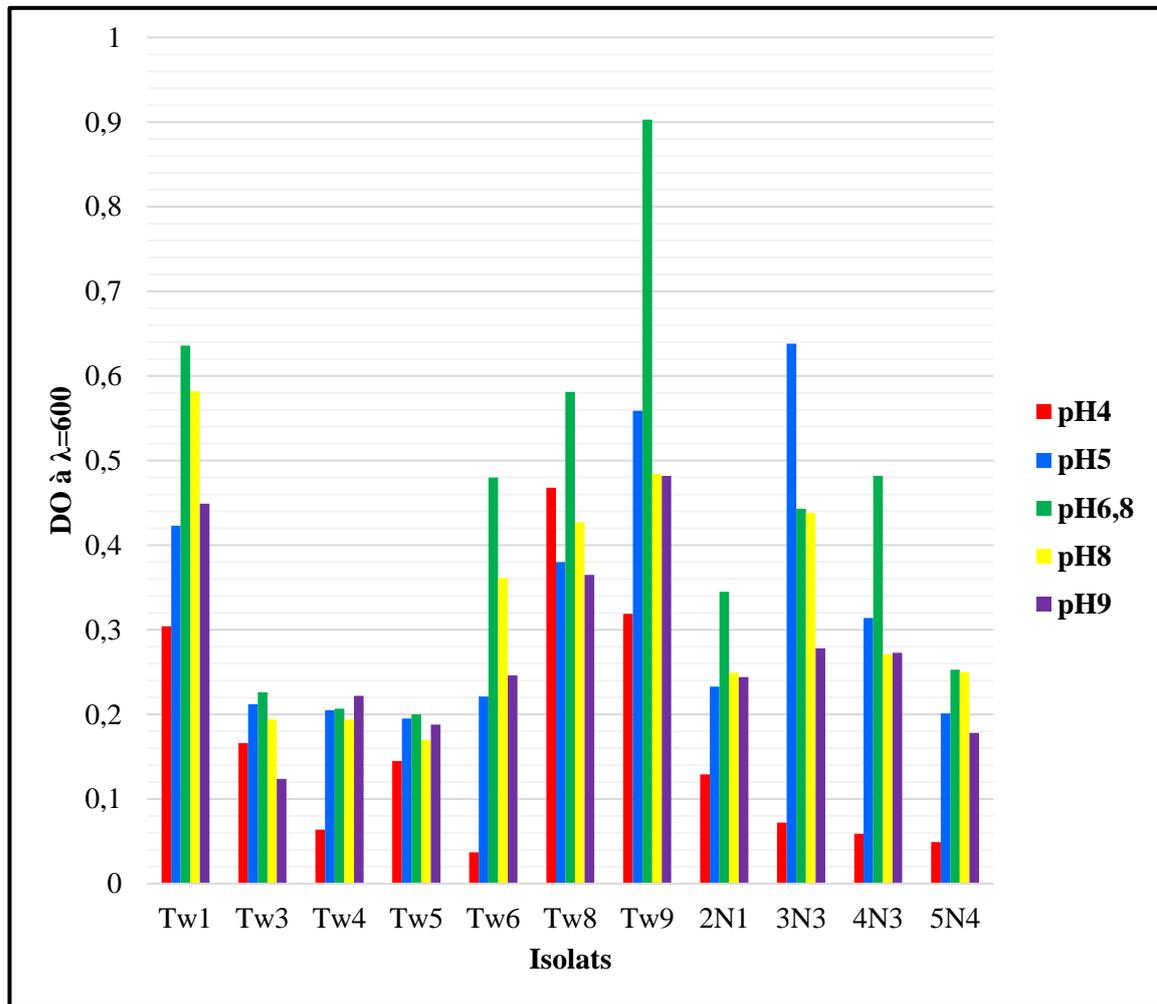


Figure 29 : Effet du pH sur la croissance des isolats.

Il est aussi important de noter que ces isolats sont capables de tolérer des pH alcalins élevés que des pH acides, corroborant ainsi avec Jordan (1984) qui a révélé que la majorité des *Rhizobium* peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9 et a considéré que l'alcalinité était moins néfaste pour leur survie, alors que l'acidité perturbe l'adhésion des souches rhizobiales à la surface des poils racinaires lors de la phase d'infection (Chaker, 2015).

3.2.2. Effet de la température

Pour la majorité des rhizobia, la température optimale est de 28 à 31 °C et beaucoup d'entre eux sont incapables de croître à 38 °C (Graham, 1992). Des souches isolées d'un environnement chaud et sec telle que la savane du Sahel en Afrique, pouvaient tolérer des températures au-delà de 40 °C (Karanja et Wood, 1988). Dans les régions arides, la température élevée du sol affecte à la fois la vie libre et symbiotique des rhizobia (Zahran, 1999).

L'exposition aux températures hautes peut mener la perte de la capacité de l'infection chez la bactérie (Werner, 1992) à cause de la perte des plasmides symbiotiques (Chaker, 2015).

Comme la plupart des Rhizobia, nos isolats présentent une croissance optimale à 28 °C après 48 h d'incubation (Tableau 2) ainsi qu'à 20 °C après 72 h. À 37 °C la croissance est légèrement réduite. Alors qu'à 45 °C, la faible intensité de la croissance est prononcée et elle s'arrête complètement chez certains isolats à une température de 45 °C. En ce qui concerne la culture à température basse égale à 4 °C, on a noté que certains isolats, à l'exemple de Tw6, Tw8, Tw9 et 3(N3) présentaient une croissance au bout des premières 48 heures suivant l'inoculation, alors que d'autres en sont Inhibés jusqu'au dernier jour d'incubation (5^{ème} jour) (Figure 30 (a)-(h)).

Tableau 2 : Observation de la croissance des isolats aux différentes températures.

T (en °C) Isolats	4	20	28	37	45
Tw1	+ (72 h)	+++ (72 h)	+++ (48 h)	++ (48 h)	-
Tw3	-	++ (72 h)	++ (48 h)	++ (48 h)	+ (24 h)
Tw4	-	++ (72 h)	++ (48 h)	++ (48 h)	+ (24 h)
Tw5	-	++ (72 h)	++ (48 h)	++ (48 h)	+ (24 h)
Tw6	+ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (48 h)	+ (24 h)
Tw8	+ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (48 h)	+ (24 h)
Tw9	+ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (48 h)	++ (48 h)	+ (24 h)
2(N1)	-	+++ (72 h)	+++ (48 h)	++ (48 h)	-
3(N3)	+ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (48 h)	++ (48 h)	-
4(N3)	+ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (48 h)	+++ (48 h)	-
5(N4)	-	++ (72 h)	+++ (48 h)	+++ (48 h)	-

+++ : Très bonne croissance. ++ : Bonne croissance. + : Faible croissance - : Absence de croissance

Zhang et Smith (1996) ont conclu que les basses températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les rhizobia dans les régions très humides ou froides. Il a été aussi démontré qu'aucune corrélation n'existait entre les températures du site d'isolement et la capacité des bactéries à tolérer des éventuels stress thermiques (El Hilali, 2006), ce qui exclue toute relation entre les températures enregistrées à la wilaya de Khenchela (une moyenne des minima de - 2 °C et un minima absolu de - 4,8 °C rapportées par ANDI, 2015 et la capacité de nos isolats à croître à basse température.

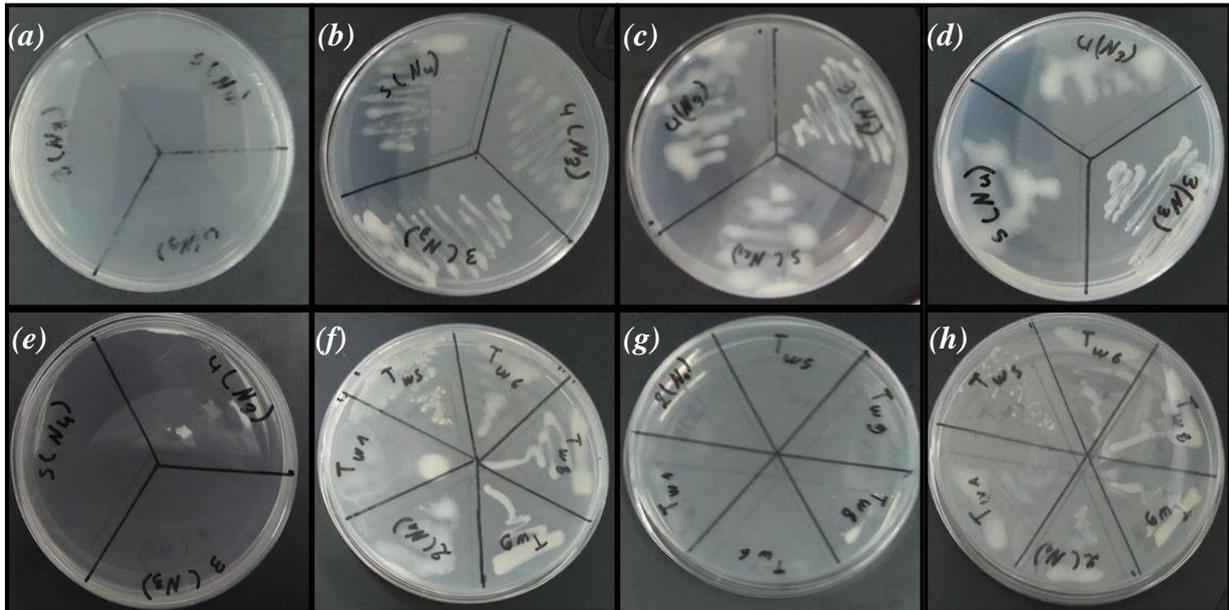


Figure 30 : Croissance de certains isolats à températures différentes.

(a) et (g) isolats 2(N1), 3(N3), 4(N3), 5(N4), Tw1, Tw5, Tw6, Tw8 et TW9 cultivés à 4 °C. (b) et (h) isolats 2(N1), 3(N3), 4(N3), 5(N4), Tw1, Tw5, Tw6, Tw8 et TW9 cultivés à 20 °C. (c) isolats 3(N3), 4(N3) et 5(N4) cultivés en 28 °C. (d) et (f) isolats 2(N1), 3(N3), 4(N3), 5(N4), Tw1, Tw5, Tw6, Tw8 et TW9 cultivés à 28 °C. (e) isolats 3(N3), 4(N3) et 5(N4) cultivés à 45 °C.

3.2.3. Effet du Chlorure de Sodium

La croissance de différents rhizobia est fortement inhibée par une concentration de 100 mM en NaCl (Singleton et al., 1982). Cependant, les souches de *Rhizobium meliloti* peuvent tolérer des concentrations en NaCl allant de 2,6 % à 3,5 % (Abdelwahab et Zahran, 1979). Zahran et al. (1994) ont isolé, à partir du lupin, des souches de *Rhizobium* sp. pouvant croître dans un milieu de culture contenant 10 % de NaCl (Drevon et Sifi, 2003).

Il a été rapporté que la sensibilité des rhizobia à la salinité dépend de la nature chimique des sels et que les chlorures sont plus toxiques que les sulfates (El Sheikh et Wood, 1989). Plusieurs données montrent que la salinité augmente la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah et al., 2001).

L'évaluation de l'effet de la concentration de NaCl inhibitrice de la croissance des onze (11) isolats testés (Figure 31) montre une nette variabilité des degrés de tolérance et de sensibilité de ces derniers. Chez les isolats les plus sensibles [Tw1, Tw6, Tw8, 3(N3), 4(N3), 5(N4)] à 1% (171 mM), la densité optique mesurée est fortement réduite, la croissance est trop faible par rapport aux autres isolats [Tw3, Tw4, Tw5, TW9, 2(N1)]. De plus, à une concentration de 2 % (342 mM), la croissance de l'ensemble des isolats a diminué, tout en

marquant une stabilité à 3% (513mM). Par contre, l'isolat Tw4 montre une pente d'augmentation significative de la DO à une concentration de 3% de NaCl.

Les isolats Tw3, Tw4, Tw5 et TW9 représentent une bonne tolérance à la salinité en présence de 5% (855mM) de NaCl avec une variabilité de croissance. Les isolats Tw3, Tw4 et Tw5 peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 10% (1710mM) de NaCl, ce qui indique que ces isolats sont susceptibles d'être des halotolérants. Il est aussi remarquable, que pour les isolats Tw1, Tw6, Tw8, 3(N3), 4(N3) et 5(N4) l'effet du stress salin n'affecte pas considérablement leur croissance. Ce qu'on peut observer généralement c'est que plus la concentration de NaCl augmente plus la croissance bactérienne diminue.

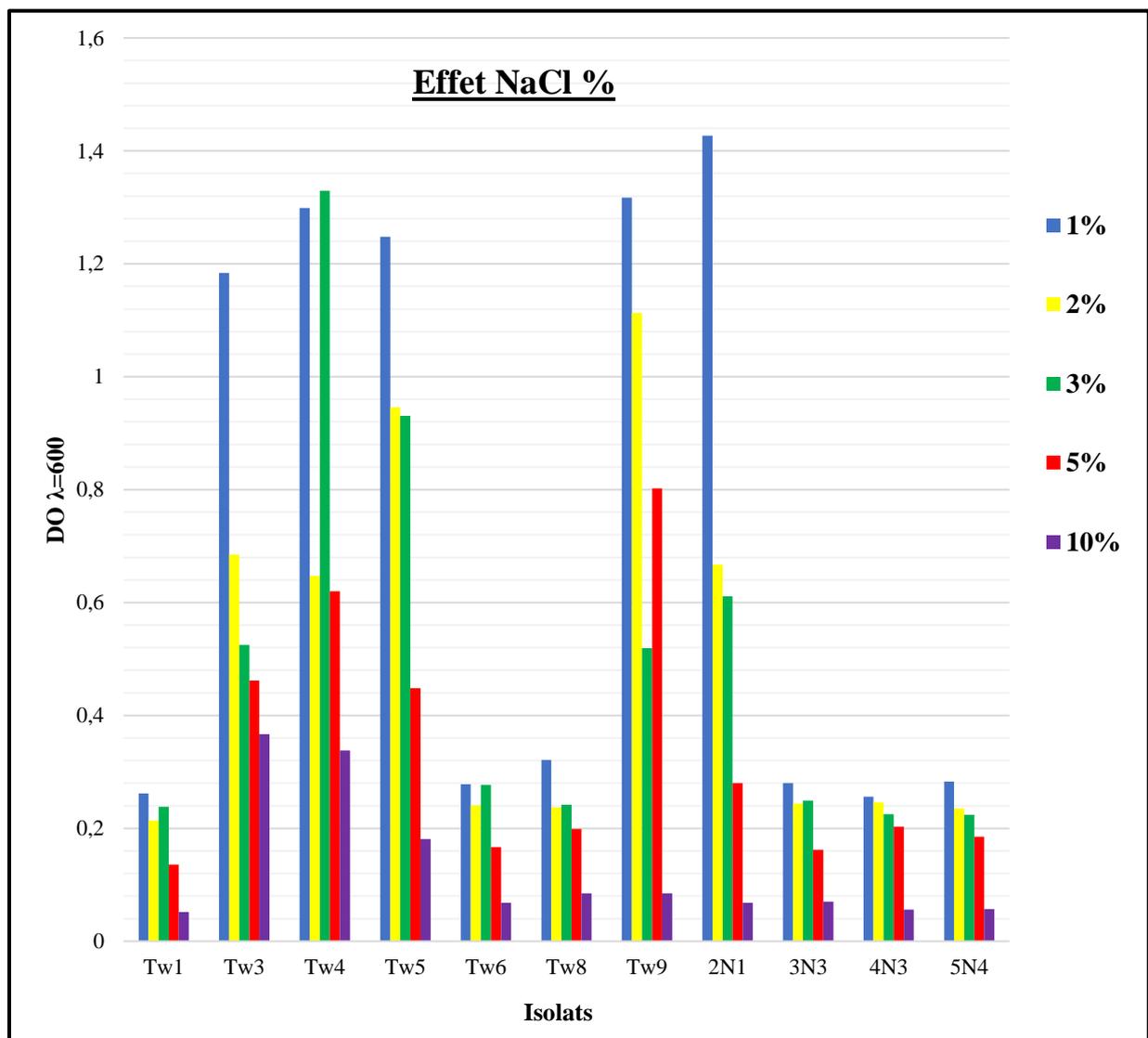


Figure 31 : Effet de NaCl sur la croissance des isolats.

3.3. Tests nutritionnels

3.3.1. Sources de carbone

Suite au suivi quotidien des cultures effectuées afin de mettre en évidence leur capacité à assimiler des substrats carbonés entant qu'une seule source de carbone, on a pu consolider les résultats observés dans le tableau 3 qui suit :

Tableau 3 : Croissance des isolats en présence de différents sucres.

Sucre isolat	Mannitol	D-Galactose	L-Arabinose	D-Saccharose	Maltose	D-Glucose
Tw1	++	+	+	++	+/-	++
Tw3	++	+	+/-	++	+	++
Tw4	++	+/-	-	++	+/-	++
Tw5	++	+	++	++	++	+
Tw6	++	+	+	++	+	+
Tw8	++	-	+/-	++	+	+
TW9	++	++	+	++	++	+
2(N1)	++	+	-	++	+/-	+
3(N3)	++	+/-	+/-	++	+	+
4(N3)	++	-	+/-	++	+/-	+
5(N4)	++	+/-	-	+	+/-	+

++ : Bonne croissance, + : croissance moyenne, +/- : une très faible croissance, - : absence de croissance.

L'évaluation de l'utilisation des différents hydrates de carbone montre que nos isolats sont capables d'assimiler les sucres testés (monosaccharide et disaccharide) comme une seule source de carbone avec une fréquence de dégradation variable.

Tous les isolats présentent une forte croissance en présence du mannitol, glucose et du saccharose, ce qui signifie leurs assimilations. Une faible croissance est observée en présence de maltose chez la majorité des isolats, ainsi que le galactose et l'arabinose où on a noté une très faible et parfois absence de croissance. On a aussi remarqué que les isolats Tw5 et Tw9 ont la capacité à assimiler toute la gamme des sources de carbone testée contrairement aux isolats 4(N3) et 5(N4) qui ont une capacité d'assimilation limitées en trois variétés des sources sus-citées. De ce fait, et conformément aux travaux menés par Wielbo *et al.* (2007), les deux premières ont une compétitivité pour la nodulation supérieure à celle des deux dernières (Figure 32).

Dans l'interaction *Rhizobium*-légumineuse, la bactérie utilise le carbone des composés organiques fourni par la plante. Le saccharose est le composé majeur transféré dans le phloème vers les racines et les nodules (Streeter, 1991).

Chakrabati *et al.* (1981) ont montré que parmi tous les Bradyrhizobia testées, seules les souches de lupin ont été capables d'assimiler l'arabinose. Plusieurs études ont montré que les rhizobia présentent une variabilité d'assimilation vis-à-vis les hydrates de carbone (Zhang *et al.*, 1991 ; Stowers et Eaglesham, 1984).

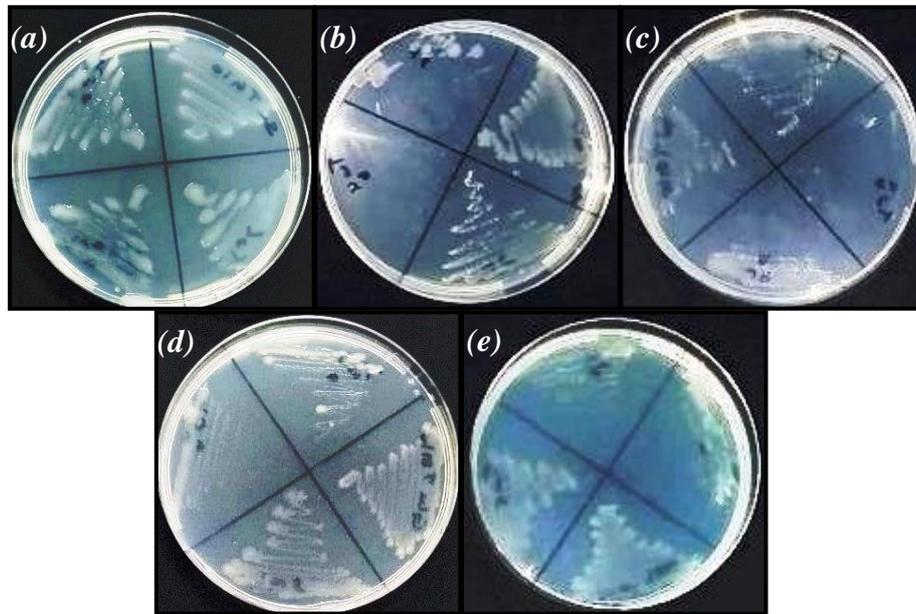


Figure 32 : Croissance de certains isolats en présence de différents sucres.

(a) : isolats Tw3, Tw4, Tw5 et Tw6 en présence de saccharose. (b) : isolats Tw3, Tw4, Tw5 et Tw6 en présence d'arabinose. (c) : isolats Tw3, Tw4, Tw5 et Tw6 en présence de galactose. (d) : isolats Tw3, Tw4, Tw5 et Tw6 en présence de glucose. (e) : isolats Tw3, Tw4, Tw5 et Tw6 en présence de maltose.

3.3.2. Source de l'azote

Les résultats enregistrés dans tableau 4 ci-dessous, tous les isolats ont révélé une grande croissance en présence de deux acides aminés qui sont l'asparagine et le glutamate de sodium, d'où la présence systématique de ce dernier dans la composition de base du milieu Defini8. Avec une affinité moindre pour l'alanine et la méthionine, tous les isolats testés ont montré une bonne croissance. Et enfin, seulement les isolats 3(N3), 4(N3) et 5(N4) n'avaient pas catabolisé la valine et la tyrosine, alors que le reste des isolats ont donné des réponses variantes entre très bonne, bonne ou faible croissance (Figure 32).

Les résultats précédents sont en accord avec ceux de Sessitsch *et al.* (1997) disant que les *Rhizobium* nodulant *Phaseolus vulgaris* L. peuvent utiliser la majorité des sources d'azote, ainsi que ceux rapportés par El-Akhal *et al.* (2009). Cependant, nos constats sont en partiel désaccord avec ceux faits par Tsegaye *et al.* (2015) lors de ses travaux portant sur les *Rhizobium* nodulant *Trigonella foenum-graecum* L. poussant en Ethiopie où tous ses isolats ont pu dégrader L-tryptophane, L-tyrosine, et L-arginine, 75 % d'entre eux ont utilisé la méthionine

et plus de 80 % des isolats ont assimilé l'alanine, L-asparagine, L-glutamate, L-leucine, L-lycine, L-phenylalanine, L-valine (Tsegaye *et al.*, 2015).

Tableau 4 : Croissance des isolats en présence de différents acides aminés.

Acide Amine Isolat	Glutamate de Sodium	Méthionine	Asparagine	Valine	Tyrosine	Alanine
Tw1	++	+	++	+	++	+
Tw3	++	+	+	+	++	+
Tw4	++	+	+	+	++	+/-
Tw5	+	+	++	+	+	+
Tw6	+	+	++	+	+	+
Tw8	+	+	+	-/+	+	+
Tw9	+	+	+	+	+	+
2(N1)	+	+/-	+	+/-	+	+
3(N3)	++	+	+	+/-	-	+
4(N3)	++	+	+	-	-	+
5(N4)	++	+/-	+	+/-	-	+

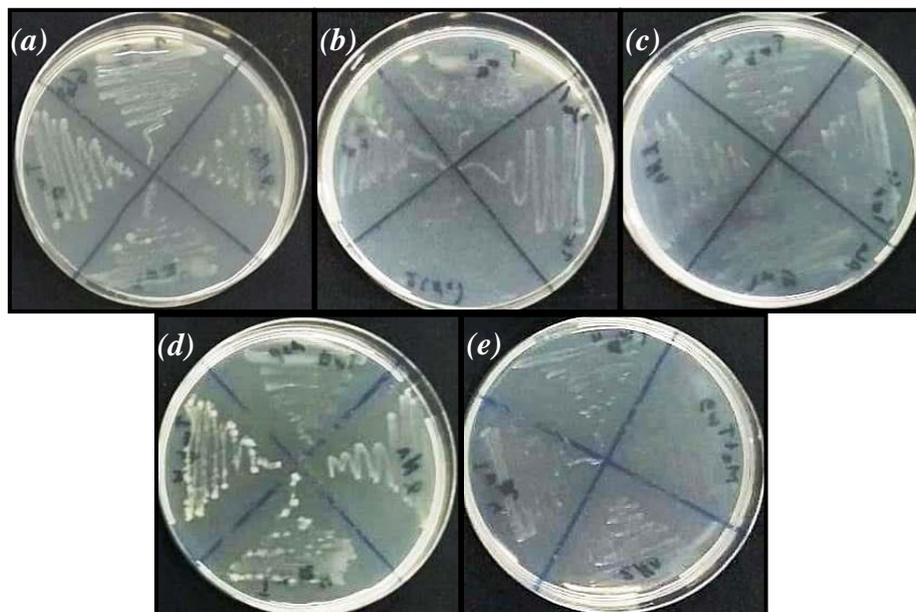


Figure 33 : Croissance de certains isolats en présence de différents acides aminés. (a) : isolats Tw3, Tw4, Tw9 et 2(N1) en présence de Glutamate. (b) : isolats Tw3, Tw4, Tw9 et 2(N1) en présence de Valine. (c) : isolats Tw3, Tw4, Tw9 et 2(N1) en présence de Alanine. (d) : isolats Tw3, Tw4, Tw9 et 2(N1) en présence d'Asparagine. (e) : isolats Tw3, Tw4, Tw9 et 2(N1) en présence de Méthionine

Conclusion

Les travaux présents dans cette étude ont été limités en une contribution à l'identification des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev., collectée de la région de Trachet, commune d'El Mahmel à la Wilaya de Khenchela située à l'Est Algérien.

Nous avons essayé de déterminer les caractères phénotypiques des isolats étudiés en adoptant des techniques d'isolement et de caractérisation compatibles avec celles propres aux rhizobia (selon Vincent, 1970 ; Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben 1994).

Suite à la caractérisation phénotypique effectuée, nous avons constaté que les onze isolats sélectionnés présentent des caractères culturels dépendant des différents milieux de culture employés. Ils ont donné des colonies lisses, muqueuses, de couleur blanche sur le milieu YMA, avec une faible absorption du rouge Congo sur milieu YMA+RC. Nous avons noté aussi qu'ils ont une croissance rapide sur le milieu YMA additionné du BTB.

L'examen microscopique des cellules bactériennes des isolats a montré une forme coccobacilles courts à Gram négatif.

L'identification phénotypique repose aussi sur une série de tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels.

Tous les isolats possèdent des enzymes nécessaires au processus d'infection (cellulase), au métabolisme azoté (uréase) et au maintien de l'état physiologique fonctionnel (la majorité des souches présente une réaction positive pour l'oxydase et chez certaines souches la présence de la nitrate-réductase était détectée) à l'exception de la catalase qui est négative pour la majorité.

L'évaluation de la tolérance ou la sensibilité de nos isolats vis-à-vis des facteurs intrinsèques a montré que certains d'entre eux sont des halotolérants et peuvent résister à une concentration élevée du NaCl allant de 5% (855 mM) jusqu'à 10% (1710 mM) ; ainsi qu'ils peuvent croître dans des températures élevées (45 °C), qui leurs confèrent la propriété de thermotolérance avec un optimum de croissance à 28 °C. Ils sont également capables de croître à un large intervalle de pH ayant les valeurs 4,5 et 9 comme limites.

Les résultats des tests nutritionnels montrent que nos isolats sont capables d'assimiler une large gamme des carbohydrates testés (monosaccharide et disaccharide) comme seule source de carbone, et l'ensemble des acides aminés comme source d'azote. ils n'exigent pas la présence de mannitol comme une seule source de carbone (Struffi *et col.*, 1998).

A la lumière de ce qui a été rapporté ci-dessus, on peut conclure que toutes les réponses morphologiques, physiologiques et biochimiques de nos isolats sont similaires à celles des BNL

et des rhizobia. De ce fait, on peut suggérer leur appartenance aux BNL et plus spécifiquement à un des genres à croissance rapide à l'exemple des *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* etc., mais cela ne peut être confirmé qu'après la soumission des présents isolats à d'autres tests d'identification phénotypiques complémentaires, tel que le test de nodulation ainsi que les tests génotypiques et moléculaires.

Une fois identifiés et sélectionnés, les isolats montrant une forte infectivité et efficacité feront l'objet des essais aux champs à fin survivre et à maintenir leur potentiel symbiotique.

Références
Bibliographiques

Abdelwahab A.M., Zahran H. (1979). Salt tolerance of Rhizobium species in broth culture. Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie. 19. p : 681-685.

Anu Singh,C. et Gary,S. (2017). Découvrir la biologie. Paris : Boeck Supérieur. p : 556.

ANDL, (2015). Invest in Algeria : fiche descriptive de la Wilaya de Khenchela. p : 2-6.

Bagnères A.G. et Hossaert-Mckey M. (2017). Ecologie chimique. Londres : ISTE. p : 99-100.

Briat, J. ; Job, D. (2017). Les sols et la vie souterraine : des enjeux majeurs en agroécologie. France : QUAE. p : 293.

Beck,D.P. ; Materon,L.A. et Afandi,F. (1993). Rhizobium-Paractique vegetable. Manual technology. Syria: ICARDA. p: 290.

Benhizia,Y. ; Benhizia,H. ; Benguedouar,A. ; Muresu,R. ; Giacomini,A. et Squartini,A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum. Syst Appl Microbiol. 2004; 27: p : 462-468.

Bibirou .,2016 : tests utilisés en bactériologie, biologie techniques de laboratoires pour laboratoire de brousse.

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

Bonaldi,K. ; Gargani,D. ; Prin,Y. ; Fardoux, J., Gully,D. ; Nouwen,N., Goormachtig S, et Giraud E., (2011). Nodulation of aeschynomene afraspera and a. Indica by photosynthetic bradyrhizobium sp. Strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction. Molecular plant microbe interaction. 24: p: 1359–1371.

Cotter P. D. et Hill C. (2003) Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews, sept 2003, p: 429 – 453.

Crossman L.C., (2004). Plasmid replicons of Rhizobium, 10th Nitrogen Cycle Meeting 2004, Biochemical Society Transactions. 33: p: 157-158.

Chaker Haddadj A. (2015). Evaluation de la tolérance à la contrainte saline chez quelques variétés de féverole (*Vicia faba L. minor*) cultivées en Algérie : Aspects morphologiques,

biochimiques, symbiotiques et agronomiques. Thèse de Doctorat en sciences Agronomique, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El Harrach- Alger

Chakrabati, S. K., M. S. Lee and A. H. Gibson. (1981). Diversity in the nutritional requirements of the strains of various *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.* **13**, p : 349-354. Cité In (El Hilali, 2006).

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

Denarié J, Debelle F, Prome JC. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry.* 65: p:503–535.

Drevon J.J., Sifi B. (2003). Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. *Quae.* p: 150-151.

El-sheikh, E. A. E., and M. Wood. 1989. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21, 889-895.

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 de L'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

El-Akhal M, Rincon A, Mourabit N, Pueyo J, Barrijal S. 2009. phenotypic and genotypic characterizations of *rhizobia* isolated from root nodules of peanut (*arachis hypogaea* l.) grown in moroccan soils. *Journal of basic microbiology* **49**, p: 415-425.

Franco, A.A. and S.M. de Faria. (1997). The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem.* 29: p: 897–903.

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology.* 52: p: 61-76.

Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* 42: p: 413-441.

Giraud E, Moulin L, Vallenet D et al. (2007). Legume symbioses: absence of nod genes in photosynthetic *bradyrhizobia*. *Science*. 316: p: 1307 – 1312.

Giles ed, Ray d. 2014. Current Opinion In Biotechnology: Biotechnological solutions to the nitrogen problem. 26: p: 19-24.

Graham PH. (1992). Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38: p: 475-484.

Geelen, M.J.H., Schoots, W.J., Bijleveld, C. & Beynen, A.C. (1995). Dietary mediumchain fatty acids raise and (n-3) polyunsaturated fatty acids lower hepatic triacylglycerol synthesis in rats. *Journal of Nutrition* 125: 2449-2456. Cité in (Michaud et al., 2002).

Hatimi A., Bani-Aameur F., Oihabi A. (2013). Caractérisation de souches de Rhizobiums autochtones des dunes : effet sur la croissance et la nutrition azotée d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Acta Botanica Gallica*. 148 :3. p: 191-199.

Hernandez B. S., and D. D. Focht. (1984). Invalidity of the concept of slow growth and alkali production in cowpea rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 206-210.

Horchani, F. ; Prévot, M. et Boscari, A. (2011). Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules.

Howieson J.G., et Dilworth M.J. (2016). Working with Rhizobia ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale. p :312.

Jaffré, T. (1995). Distribution and ecology of the conifek of New Caledonia. Ecology, of the southern conifers (ed. by, N. J. Enright and R. S. Hill), p: 197-222. Melbourne University Press, Melbourne.

Jarvis, B. D. W.; Mc lean.T. S.; Robertson, I. G. C. et Fanning, G. R. (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20, 42-52.

Jimenez-Zurdo, J.I. ; Mateos, P.F. ; Dazzo, F.B. ; et Martinez-Molina, E. (1996). Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Soil. Biol. Biochem.* **28**: p: 917-921. Cité in (Michaud *et al.*, 2004).

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

Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (2017). *Probiotics and Plant Health* (ebook). Singapore: Springer, p: 53.

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

Kouakou, R. (2011). Diversité génétique des rhizobia associées à un champ de pois d'angle (*Cajanus cajan* L.) à Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire). Diplôme d'agronomie approfondie. École supérieure d'agronomie de l'Institut national polytechnique. p: 24

Kaneko T. ; Nakamura Y. ; Sato S. et al., (2002). Complete genomic sequence of nitrogenfixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA research.* **9**: p: 189.

LPWG. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, **66** (1): p: 44–77.

Luciński R, Polcyn W., Ratajczak L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochim. Pol.* **49**: (2): p: 537-546.

Lindström K, Murwira M, Willems A et Altier N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology.* **161**: p: 453–463.

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

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

- Mateos, P.F., Jimenez-Zurdo J.I., Chen J., Squartini A. et al. (1992).** Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Appl. Environ. Microbiol. **58**: p: 1816-1822.
- Mateos, P. F., Baker D. L., Petersen M. et al. (2001).** Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Can. J. Microbiol. **47**: p: 475-487.
- Mbengue, M. (2010).** Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LYSMRLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*. Université de Toulouse III- Paul Sabatier. p :13-14.
- Michaud, P; Belaich, A; Courtois, B. (2002).** Cloning, sequencing and overexpression of a *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS carboxymethyl-cellulase gene Appl Microbiol Biotechnol **58**: 767. [en ligne]. Consulté le 05.07.19 <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-002-0953-4>>
- Mobley L.T.H., 1992.** – Urease Microbial .J Lederberg (ed). Encyclopedia of microbiology .4: p: 327-346.
- Moreira, F. M. S., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco. 1993.** Characterisation of rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, p: 135-146.
- Neelawan,P. (2012).** Classification and Taonomy of Rhizobia. In : Neelawan,P. Phenotypic and Genotypic Diversity of Rhizobia [en ligne]. Bentham Science Publishers. Thailand. p : 3-4 <<https://books.google.dz/books?id=mZj1AQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=rhizobia&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwipOHIjtrfAhVIAMMBHWe2AWUQ6AEIKDAA#v=onepage&q=rhizobia&f=true>>.
- Ott, T. Van Dongen, J.T.; Gunther, C.; Krusell. L.; Desbrosses, G.; Vigeolas, H. Bock, V. ; Czechowski, T. ; Geigenberger, P. ; Udvardi, M.K. (2005).** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Current Biology. **15** : p : 531–535.

- Pagano, M.C. (2008).** Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration Plant Soil Environ, 54, 2008 (11) p: 498-508.
- Perry, J. ; Staley, J. ; et Lory, S. (2004).** MICROBIOLOGIE : COURS ET QUESTIONS DE REVISION. PARIS : DUNOD. p: 633.
- Pratt, C. et Cornely, K. (2019).** Biochimie. Paris : DE BOECK Supérieur. p: 465.
- Prescott, J. ; Harley J. ; Klein D. ; Willey, M. ; Sherwood, L. ; Woolverton, C. et (2010).** Microbiologie. Paris: de Boek. p : 236 ; 237 ; 526 ; 704.
- Quezel, P. et Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 tomes. Ed. C.N.R.S. Paris, p : 1170.
- Rai AN, Söderbäck E, Bergman B. (2000).** Cyanobacterium-plant symbioses. New Phytologist. 147: p : 449-481.
- Raven P. ; Evert R. et Eichhorn S. (2007).** Biologie végétale. Paris : DE BOECK. Page: 696-697.
- Raza, S.; J̄rnsgard, B.; Abou-Taleb, H.; Christiansen, J. (2001).** Tolerance of Bradyrhizobium sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. Letters in Applied Microbiology. 32. p : 379-383
- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcon-Aguilar, C., Jeffries, P. & Barea, J.M. (2001).** Management of indigenous plant- microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. Applied Environmental Microbiology, 67: p:495-498
- Roba, M. (2016).** Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuse metalliocolles : effet des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobia symbiotique d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus*. Thèse pour obtenir le grade de docteur. University de Montpellier. p:11.
- Saadallah K., Drevon J.J., et Abdelly C., (2001).** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21: p : 627-634. INRA, EDP Sciences.
- Schneider A. et Huyghe C. (2015).** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Paris : Quae. p: 81-136.

- Selami, N. (2015).** Etude des associations symbiotiques de *Retama monosperma* : approche morphologique, anatomique et ultra-structurale, caractérisation moléculaire des isolats. Université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf. p: 13.
- Sessitsch A, Hardarson G, Akkermans A, DeVo W. 1997b.** Characterization of *rhizobium etli* and other *rhizobium* spp. That nodulate *phaseolus vulgaris* l. In an austrian soil. Mol. Ecol **6**, 601-608.
- Singleton P. W., El Swaify S. A., and B. B. Bohlool. (1982).** Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. Appl. Environ. Microbiol. **44**, p: 884-890.
- Skorupska, A.; Wielbo, J.; Kidaj, D. et Marek-Kozaczuk, M. (2010).** Enhancing *rhizobium*–legume symbiosis using signaling factors. in Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) microbes for legume improvement . Springer-verlag/wien printed in germany. p: 27.
- Somasegaran P. et Hoben H J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.
- Stowers, M. D. et Eaglesham. A. R. J. (1984).** Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. Plant Soil. **77**, p: 3-14.
- Streeter, J. G. (1991).** Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. Adv. Bot. Res. **18**, 129–187.
- Suty, L. (2015).** Les végétaux : des symbioses pour mieux vivre. France : QUAE. p: 20, 22.
- Taylor, L.P. et Grotewold, E. (2005).** Flavonoids as developmental regulators. Curr Opin Plant Biol. **8**:317-323.
- Tsegaye, M., Assefa, F. and Zeleke, J. (2015).** Symbiotic and phenotypic characterization of *Rhizobium* isolates nodulating fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) from North and East Shewa, Ethiopia. Int. J. Agron. Agri. Res. **7**(1): p: 93-104. Vishunavat, K. and Kolte.
- Vincent JM. (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetza, R.V., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., and Long, S.R. (2000).** Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**, p: 13407-13412

Werner d. (1992). Symbiosis of plants and microbes. Philipps-Universität Marburg Germany. Edition Chapman and Hall.

Wielbo J., M. Marek-Kozaczuk, A. Kubik-Komar and A. Skorupska. (2007). Increased metabolic potential of *Rhizobium spp.* is associated with bacterial competitiveness. *Can. J. Microbiol.* 53: 957-967

Willey, M. ; Sherwood, L. ; ET Woolverton, C. (2018). Microbiologie De Prescott. PARIS : DE BOECK. p: 676 ; 677, 679.

William G. Hopkins. (2003). Physiologie végétale. Paris: Boeck Supérieur. p:112

Xu L. M. ; Ge C. ; Cui Z. ; Li, J. and Fan, H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, p: 706–711.

Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, p: 968-989.

Zhang, X.-X., R. Harper, M. Karsisto, and K. Lindström. (1991). Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, p: 104-113.

Zhang, F., and D. L. Smith. (1996). Inoculation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant Soil.* **179**, p: 233-241. Cité in (El Hilali, 2006).

Webographie

CAS. New Subfamily Classification of the Leguminosae and Insights into Plastomes of the Mimosoid Clade [en ligne]. (Page consultée le 17-04-2019) <http://english.cas.cn/newsroom/research_news/201703/t20170306_174601.shtml>.

Climate-data. Climat Khenchela. [en ligne]. (Page consultée le 07-05-2019) <<https://fr.climate-data.org/afrique/algerie/khenchela/khenchela-3702/>>

GBIF Secretariat. *Trigonella foenum-graecum* L. [en ligne]. (Page consultée le 07-05-2019) <<https://doi.org/10.15468/39omeiaccessed>>

Plantes-botanique. Ordre des Fabales [en ligne]. (Page consultée le 21-03-2019). <https://www.plantes-botanique.org/ordre_fabales>

Weir, B.S. The current taxonomy of rhizobia. [en ligne]. (Page consultée le 10-05-2019). <<https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>>

Wikipedia, Carte géographique localisant la commune d'El Mahmal -Wilaya de Khenchela [en ligne]. (Page consultée le 10-06-2019). <https://fr.wikipedia.org/wiki/El_Mahmal#/maplink/1>

Annexes

Annexe 01

Milieux de culture et solutions utilisées

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

Mannitol	10,00
K ₂ HPO ₄	0,50
NaCl	0,10
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0,20
Extrait de levure	0,50
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min.

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

YMB	1000 ml
Agar	18
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min.

Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de Rouge Congo	10 ml
Agar	18
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min.

Après l'ajustement de pH on ajoute 10 ml de Rouge Congo (0,25 g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillé) puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu YMA+ BTB (Bleu de Bromothymol) en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de bleu de Bromothymol	05 ml
Agar	15
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de Bromothymol (0,5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar + Pourpre de Bromocrésol) en g/l

Glucose	10
Peptone	05
Solution stock de BCP	10 ml
Agar	18
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min.

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

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

Tryptone	05
Extrait de levure	03
CaCl ₂ H ₂ O	0,87
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min.

Composition du milieu Défini 8 modifié en g/l (Vincent, 1970)

KH ₂ PO ₄	0,3
Na ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄	0,21
CaCl ₂	0,21
Glutamate de Sodium	01
Mannitol	01
Oligoéléments	01 ml

Solution oligoéléments en mg/l :

H ₃ BO ₃	50
Fe SO ₄ 7 H ₂ O	35
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	08
MnSO ₄ 4 H ₂ O	40
Zn SO ₄ 7 H ₂ O	16
pH	6,8
Autoclavage	120 °C pendant 20 minutes

Annexe 02

Coloration de Gram

Avant de procéder à la coloration de Gram et sous la hotte à flux laminaire « STERIL BIO BAN model 48 », une préparation de frotti est indispensable. Cette dernière est réalisée à partir de cultures en YMA+RC sur des lames, où l'ose prélevée dispersée dans une goutte d'eau distillée stérile, puis séchée et fixée.

Le protocole expérimental consiste à :

- Recouvrir la lame avec le Violet de Gentiane et laisser agir pendant 01 minute,
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte le mélange « Alcool-Acétone »,
- Laver à l'eau distillée
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir pendant 01 minute,
- Laver à l'eau distillée,
- Sécher avec un papier absorbant,
- Observer au microscope (x 100) en rajoutant l'huile à immersion.

Annexe 03

Tableaux des différents résultats

Tableau a : Résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats au NaCl après 48 heures d'incubation.

Isolat [NaCl]	Tw1	Tw3	Tw4	Tw5	Tw6	Tw8	Tw9	2(N1)	3(N3)	4(N3)	5(N4)
1%	0,262	1,184	1,299	1,248	0,278	0,321	1,317	1,427	0,28	0,256	0,283
2%	0,214	0,685	0,647	0,946	0,241	0,237	1,113	0,667	0,244	0,246	0,235
3%	0,238	0,525	1,329	0,931	0,277	0,242	0,519	0,611	0,249	0,225	0,224
5%	0,136	0,462	0,62	0,448	0,167	0,199	0,802	0,28	0,162	0,203	0,185
10%	0,052	0,367	0,338	0,181	0,068	0,085	0,085	0,068	0,07	0,056	0,057

Tableau b : Résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats au pH après 48 heures d'incubation.

Isolat pH	Tw1	Tw3	Tw4	Tw5	Tw6	Tw8	Tw9	2(N1)	3(N3)	4(N3)	5(N4)
4	0,304	0,166	0,064	0,145	0,037	0,468	0,319	0,129	0,072	0,059	0,049
5	0,423	0,212	0,205	0,195	0,221	0,38	0,559	0,233	0,639	0,314	0,201
6,8	0,636	0,226	0,207	0,2	0,48	0,581	0,903	0,345	0,443	0,482	0,253
8	0,582	0,194	0,194	0,17	0,361	0,427	0,484	0,249	0,438	0,271	0,25
9	0,449	0,124	0,222	0,16	0,246	0,365	0,482	0,244	0,278	0,273	0,178

Année universitaire : 2018/2019

Présenté par : *BENDAIRA Zineb*
FELTEN Souheila

Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse
Trigonella gladiata Stev.

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

Résumé :

Ce travail est une contribution à la caractérisation phénotypique des isolats bactériens nodulant la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev., collectée dans la wilaya de Khenchela située dans l'Est algérien. Un total de onze isolats a été sélectionné de coccobacilles courts à Gram négatif après une étude microscopique et morphologique, suivi d'une étude des caractères culturels révélant une croissance rapide pour l'ensemble des isolats, ainsi que d'autres tests physiologiques, biochimiques et des tests nutritionnels. Selon les résultats obtenus, les isolats portent des caractères phénotypiques similaires aux (BNL). Bien que cette caractérisation reste insuffisante, Elle nous permet quand même d'établir des hypothèses quant à la taxonomie des isolats.

Mots Clés : Symbiose ; BNL ; Légumineuse ; *Trigonella gladiata* Stev. ; Caractérisation phénotypique.

Laboratoire de recherche : Biologie moléculaire et cellulaire.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *M. KITOUNI Mahmoud* (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : *M. CHABBI Rabah* (Maître assistant A - UFM Constantine),
Examinatrice : *M^{me}. BOUZERAIB Latifa* (Maître assistante A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 11/07/2019