



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

Caractérisation phénotypique du microsymbiote de la légumineuse *Trigonella gladiata*

**Présenté et soutenu par : - Dekdouk Lilia
- Ziada Meriem**

Le : 16/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mme N.RIAH	(MC – UFM Constantine).
Rapporteur :	Mr R.CHABBI	(MAA- UFM Constantine).
Examinatrice :	Mme N.SAKHRI	(MC- UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

A Dieu Le tout Miséricordieux, ton amour, ta miséricorde et tes grâces a notre endroit qui nous ont fortifiée dans la persévérance et l'ardeur au travail.

A Mr.Chabbi pour tous les efforts qui a fait pour nous ; pour tous leur conseils et remarques

Nos remerciements s'adressent les jurys de notre soutenance Dr. Sakhri et Dr. Riah et Mr.Chabbi

Nos remerciements s'adressent particulièrement au Professeur Amar BENGUEDOUAR et au Professeur Yacine BENHIZIA, de nous avoir accueillies au sein du laboratoire ;

A notre model Mr BENHIZIA qui par son humanité et sagesse a su nous guidé et nous encourager de prêt comme de loin pendant ces dernières années et nous a beaucoup aidé afin de réaliser ce travail, il nous a aiguillées à tout moment par ses précieux conseils nous vous remercions du fond du cœur et nous vous sommes reconnaissantes ;

A Melle Meriem Gacci ; Mme Ibtissem Guerguouri ; Melle Leila ; Melle Hanene qui nous a assistées et guidées malgré toutes ses obligation nous vous remercions par leur aide leur conseils bénéfiques et leur sympathie.

A notre père avant qu'il soit notre professeur Mr BENGUEDOUAR Professeur à L'université Constantine qui grâce a sa bonneté et son grand cœur cette spécialité » Ecologie Microbienne est devenue une passion pour nous nous vous remercions de nous avoir acceptées dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne et nous avoir aidées pendant le trajet de ces trois dernières années nous l'oublierons jamais

A toute l'équipe du laboratoire des Biotechnologies du département de Microbiologie de l'université des frères Mentouri de Constantine pour leur soutien matériel et moral

Nous présentons par avance mes excuses aux personnes que j'ai oublié de remercier.

DEDICACE

A ma mère Dj.Messaouda ma source de force qui a fait de moi la femme que je suis aujourd'hui, tu as toujours été prête à tout sacrifier pour le bien de tes enfants et leur monterai que ce n'est jamais assai et que la vie demande toujours un plus pour frôlait la perfection

A mon père Mouloud que dieu bénisse son âme

A mes frères Titou et Fares qui je sais ma réussite est très importante pour vous

A mes grandes sœurs Sana, Amel, Imen qui ont toujours été présentes prêtes à me soutenir et me reconforter en toutes circonstances vous représentez pour moi tout mon univers

A mes amour roudaina , loudjeine , lina , assil , nourssine mes nièces, et seyfou, midou , mamine , yazen mes nouveaux qui représente tout le bonheur que j'ai pu demander au bon Dieu

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

Aux mes amis Fouzia, Sara, Imen , Choubeila , Fatma, Chaïma , Yousra , Khawla qui on tous contribué quelque part de prêt ou de loin à ma réussite

LILIA

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Ma mère ; tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir, tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte et Mon Père pour leur encouragement et a mon marié votre fierté de moi me vaut tous les diplômes monde

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

Aux mes amis Fouzia, Sara, Imen , Fatma, sihem et naouel qui on tous contribué quelque part de prêt ou de loin à ma réussite

MERJEM

الملخص

نباتات العائلة البقولية قادرة على الاتحاد مع بكتريا التربة لتكوين علاقة تعايشية تسمح بتثبيت اللازوت الجوي في عضية خاصة هي العقد الجذرية

دراستنا تعتمد عليه *Trigonella gladiata* ودراسة الوصف المظهري و التعايشي للسلاطات المعزولة في وجود سلاطات مرجعية

حسب النتائج المحصلة النمو السريع للسلاطات اضافة لاستعمال المواد الكربونية اظهرت سلوك مقارن بما هو عند جنس *Rhizobium*

كما تحصلنا ايضا على تحمل عالي لـ NaCl . pH ودرجات الحرارة عند جميع السلاطات

الكلمات المفتاحية

Trigonella gladiata ; *Rhizobium* ; وصف ; عزل ; التعايش

Abstract :

The plants of the legume family are able to associate with soil bacteria to establish a symbiotic relationship for fixing atmospheric nitrogen in specialized organs, nodules.

Our study is to isolate stem from root nodules *Trigonella gladiata* and study the phenotypic characterization and symbiotic strains isolated in attendance reference strains.

From the results obtained the rapid growth of strains and the assimilation of carbon substrates revealed similar profiles to those of *Rhizobium*, and also obtained a large tolerance to NaCl, pH and the temperature was noted for the entire collection.

Keywords: Isolation, symbiosis, characterisation, *Trigonella gladiata* , *Rhizobium* .

Liste des tableaux

Tableau1 : Taxonomie de la plante <i>Trigonella gladiata</i>	6
Tableau2 : les derniers remaniements de la classification des rhisobia selon Weir 22février2014.....	9-16
Tableau 3 : isolats et souches de références utilisés.....	27

Listes des Figures

Figure 1 : Cycle d'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic,2009).....	2
Figure 2 : <i>Trigonella gladiata</i> (chabbi ,2014).....	7
Figure 3: Dialogue moléculaire de la symbiose légumineuse <i>rhizobium</i> (Raseberg , 1997)..	17
Figure 4 : Localisation géographique des zones de prélèvements.....	21
Figure 5: Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).....	22
Figure 6 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).....	23
Figure 7 : croissance sur YMA+RC	27
Figure 8 : croissance des bactéries sur milieu GPA.....	28
Figure 9: la croissance sur YMA.....	28
Figure 10 : Acidification du milieu YMA+BTB (Après 24h)	29
Figure 11 : Coloration de Gram [G : $\times 100$].....	29
Figure 12 : Test de la nitrate réductase.....	30
Figure 13 : Test d'uréase négatif (-)	31
Figure14 : Test d'uréase positif (+) (TN1)	31
Figure15: Test de cellulase positif (+)	32
Figure16 : Test de cellulase négatif (-) (F)	32
Figure17 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches étudiées T= 24h.....	33
Figure18 : Effet du pH sur la croissance des isolats T= 24h.....	34
Figure19: Effet du pH sur la croissance des souches de références T=24.....	34-35

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I - L'azote	2
I - 1- Cycle de l'azote.....	2
I - 2- Fixation de l'azote	3
I -3- Nitrification	3
I -4- Dénitrification	4
I -5- Ammonification	4

II -Symbiose Rhizobium-légumineuse

II -1- Les légumineuses	5
II -1-1- La légumineuses fenugrec	5
II-1-2- Historique de la plante	6
II-1-4 - Taxonomie de la plante	6
II-1-5- Morphologie de la plante	6
II-1-6- Les principaux constituants de la plante	7
<i>II -2-Rhizobium</i>	
II -2-1- Description	7
II -2-2-Principales caractéristiques	7
II -2-3-Taxonomie des rhizobium	8-16

III- Nodulation

III-1- Mécanismes de la nodulation	16-17
III-1-1- Formation des bactéroïde.....	18

III-1-2- Les étapes de la nodulation.....	18-19
III-3- Génétique de fixation	20

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I -isolement des bactéries nodulants le fenugrec (*Trigonella gladiata*)

I-1- Collecte des nodules	21
I-2- Conservation des nodules.....	22
I-3- Stérilisation des nodules	22
I-4- Isolement des bactéries a partir des nodules	22

II - Caractères culturaux

II -1- Principaux milieux de cultures utilisés	23
II -2- Purification des isolats	24
II -3- Examen microscopique	24
II -3-1- Coloration de Gram	24
II -4- Conservation des isolats	24

III - Caractérisation phénotypiques des isolats

III-1- Testes biochimiques	25
III-1-1- Réduction des nitrates	25
III-1-2- Activités cellulosiques	25
III-1-3- Hydrolyses de l'urée	25
III -2- Testes physiologiques	26
III -2-1- Effet de la température	26

III -2-2- Effet du pH	26
III -2-3- Tolérance au NaCl	26

Chapitre 3 : Résultat et discussion :

I - Caractère culturaux	27-29
I-1- Examen microscopique.....	29
II - Caractérisation phénotypique des bactéries.....	30
II -1- Teste biochimique	30
II -1-1-Réduction de nitrate.....	30
II -1-2- Hydrolyse de l'urée.....	31
II -1-3- Activité cellulosique.....	32
II -2-Testes physiologique.....	32
II-2-1- Tolérance au NaCl.....	32-33
II -2-2- Effet de température.....	34
II -2-3- Effet du pH.....	34-35
Conclusion	36

Bibliographie

INTRODUCTION

I -Introduction

Le sol constitue un support pour différents cycles d'échanges d'énergie et de transfert de substances entre les différentes entités qui l'abritent. Un des cycles les plus importants est le cycle de l'azote. La fixation biologique de l'azote (N_2) s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre les légumineuses et les rhizobium.

La réduction de l'azote est réalisée généralement au niveau des racines des plantes dans des organes spécialisés appelées nodosités. Le processus de la fixation symbiotique de l'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. (Pawlowski et Bisseling, 1996).

Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.L.) comprenant notamment les espèces du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, qui ont une signification scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour cette raison et en tenant compte de l'importance des légumineuses dans la consommation animale et humaine, une certaine attention est donnée à l'écologie des B.N.L (Ibekwe ,1995). Dans l'objectif d'étudier les bactéries associées aux nodules des racines des espèces des légumineuses du genre *Trigonella* (particulièrement *Trigonella gladiata*). Nous avons effectuées un isolement des souches à partir des nodules racinaires de fenugrec puis une caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests biochimiques : recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase), et une série de tests physiologiques : (pH, T°C, NaCl).

-

CHAPITRE 01

Revue Bibliographique

I - L'azote

L'azote est un nutriment essentiel et limitant pour le développement des plantes bien que majoritaire dans l'atmosphère, le diazote (N_2) n'est pas directement assimilable par les végétaux. En revanche certaines plantes peuvent s'associer en symbiose avec des microorganismes diazotrophes qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique, notamment grâce à la nitrogénase un complexe enzymatique qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique en ions de l'ammonium (NH_4^+) assimilable par la plante (Dénarie,1996).

I - 1- Cycle de l'azote

Le Cycle de l'azote est très complexe; le schéma suivant en présente une simplification.

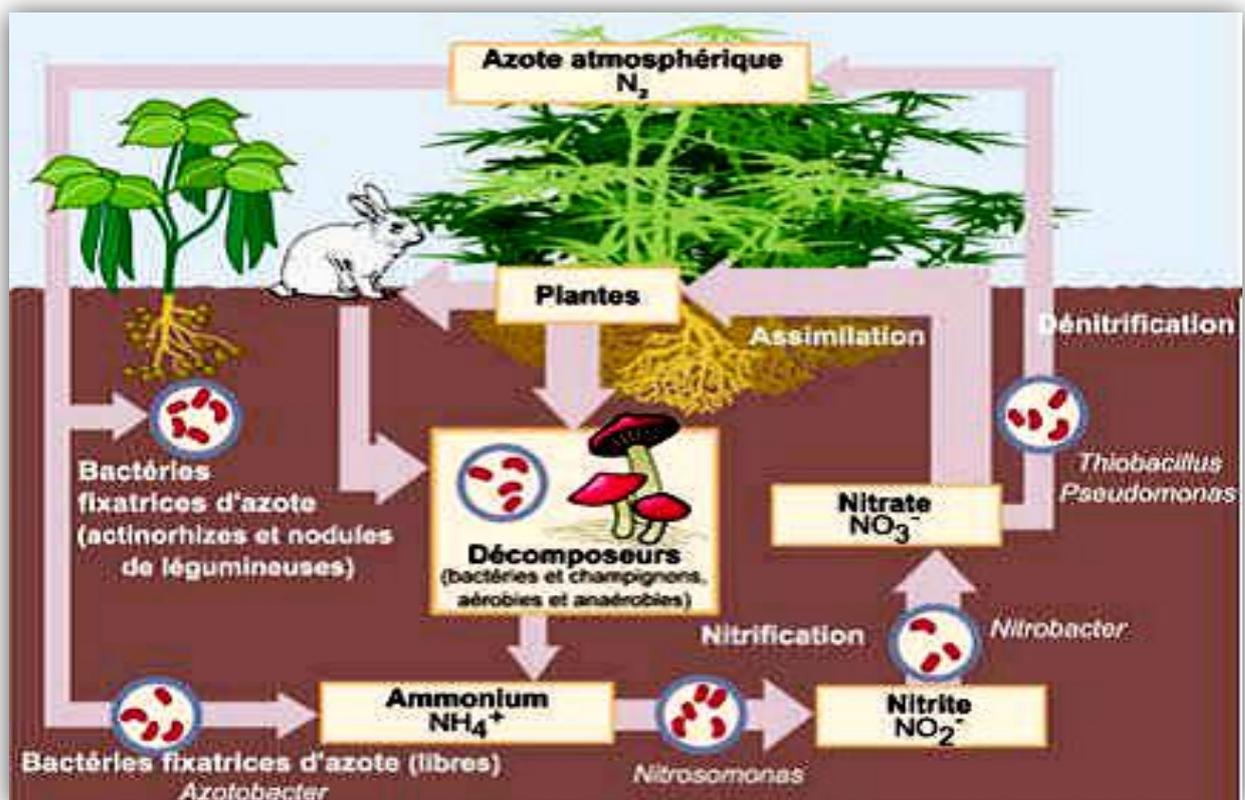
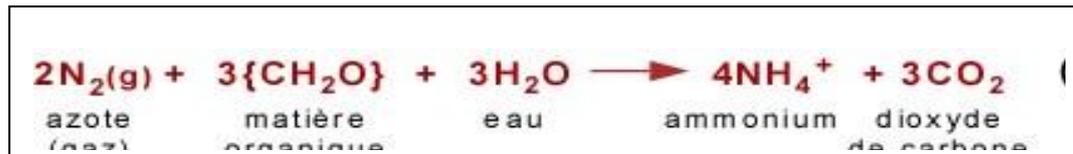


Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic.,2009)

I - 2- Fixation de l'azote

La fixation de l'azote correspond à la conversion de l'azote atmosphérique en azote utilisable par les plantes et les animaux, elle se fait par certaines bactéries qui vivent dans le sol ou dans l'eau et qui réussissent à assimiler l'azote diatomique N_2 . Il s'agit en particulier des cyanobactéries et de certaines bactéries vivant en symbiose avec des plantes (entre autres, des légumineuses) (Lidmemann ., 2003). La réaction chimique type est :



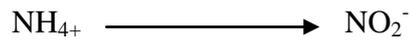
Dans les sols où le pH est élevé, l'ammonium se transforme en ammoniac gazeux:



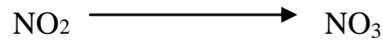
I -3- Nitrification

Chez la majorité des plantes supérieures, la source d'azote est représentée par le nitrate contenu dans les sols, venant soit de la minéralisation par décomposition des matières organiques soit par l'apport de nitrates par l'intermédiaire d'engrais azotés (Tourte *et al*, 2005).

La nitrification, soit l'oxydation de NH_3 en NO_3^- est couramment réalisée dans les sols bien drainés, à pH neutre, suite à l'activité des bactéries nitrifiantes (Madigan *et al*, 2007) . La première étape de la formation du nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite NO_2^- par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*. Le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter* (Hopkins, 2003) . Selon les réactions suivantes :



Ions ammonium *Nitrosomonas* ions nitrite



Ions nitrite *Nitrobacter* Ions nitrate

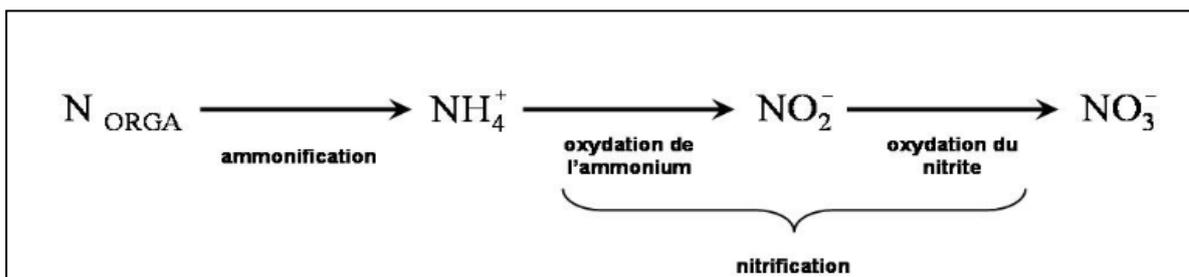
I -4-Dénitrification

Un processus anaérobie au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux N_2 et l'oxyde d'azote N_2O , qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al*, 2007) . C'est la principale voie de formation biologique de N_2 . De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pracoccus*, *Pseudomonas*. (Madigan *et al*, 2007).

I -5- Ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH_4^+) sous l'action de micro-organismes hétérotrophes qui utilisent des substrats carbonés comme source d'énergie car, elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO_2^- en NO_3^- ; Cette forme est transitoire et sera transformé ensuite en azote nitrique (Vale, 2006).

Vu la diversité des micro-organismes ammonifiants, l'ammonification est un processus sans exigence écologique particulière, car quelles que soient les conditions de l'environnement, il se trouve toujours dans les sols des espèces microbiennes ammonifiantes adaptées à ces conditions, sauf bien sûr s'il s'agit de conditions incompatibles avec la vie. (Barbbault, 2009).



II -Symbiose Rhizobium-légumineuse

II -1- Les légumineuses

Les légumineuses sont des végétaux supérieurs qui appartiennent à la famille des léguminosae (ou Fabaceae), de l'ordre des Fabales. Elles forment l'une des plus grandes Familles des plantes (Broughton, 1983) et se divisent en trois sous-familles: les Papilionacées, les Mimosacées et les Césalpinacées. On y trouve environ de 674 genres (Van Berkum et Eardly, 1998) et approximativement 19700 espèces (Polhill et Raven, 1981). Les espèces de la sous-famille papilionacées sont présentes dans le monde entier (Rachie, 1979) alors que les deux autres sous-familles sont principalement constituées d'espèces ligneuses de régions tropicales ou sub -tropicales. Sur la totalité des légumineuses recensées, on estime à 20% celles qui ont été étudiées du point de vue de leur nodulation (Dommergues et al.1998).

Parmi les espèces examinées, 97% des Papilionacées (pois haricot, fève, lentille, ...), 90% des Mimosacées et 23% des césalpinacées ont été trouvées capables de noduler parmi ces trois sous-familles, il existe quelques espèces non-nodulantes (Dommergues et al.1998) mais la très grande majorité des légumineuses sont nodulées (de Faria et *al*, 1989, Allen and Allen, 1981).

La famille des légumineuses est très diversifiée dans les différentes régions du globe, avec des sites spécifiques pour certaines espèces (Martinez-Romero et Caballero Mellado 1996)

II-1-1-La légumineuse fenugrec

Le fenugrec ou trigonelle est une plante aromatique de la famille des légumineuses qui nous vient d'Asie et d'Afrique du nord. Ses jeunes feuilles se dégustent en salade ou sont utilisées pour parfumer les plats, mais ce sont ses graines, torréfiées puis moulues, qui sont employées comme épice. Apéritives et anti-inflammatoires, elles faisaient déjà partie des remèdes traditionnels du temps de l'Égypte antique.

Ce sont surtout leurs propriétés sur la sphère digestive et l'inflammation qui sont utilisées en phytothérapie. Les graines de fenugrec sont en effet apéritives, digestives, carminatives et anti-spasmodiques. Elles ouvrent l'appétit, facilitent la digestion, lutte contre les ballonnements et les douleurs abdominales. Anti-inflammatoires et anti-rhumatismales,

elles sont recommandées pour soulager les inflammations respiratoires et cutanées et les douleurs rhumatismales.(Patriarca et *al*, 2004)

II-1-2- Historique de la plante

Fenugrec est une plante dicotylédone de la famille des légumineuses connue sous les noms :

Arabe : hélba - espagnole : las olholvas - italien : fieno greco - allemand : bockshorn

Le fenugrec est connu depuis la plus haute l'antiquité. Les grecs autrefois le cultivaient pour le transformer en foin. On le cultive de nos jours comme plante fourragère en Arabie saudi ; en Syrie et en Égypte. Il existe un proverbe égyptien qui dit : heureux sont les hommes dont les pieds pressent la terre sur la quelle croit le helbé. Cette légumineuse est aussi cultivée sur quelques fermes du midi de la France (Gustave Heuzé ,1861)

II-1-4- Taxonomie de la plante

Régne	Plantae
Sous-Régne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnolipsida
Cladus	Fabidees
Order	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Trigonella</i>
Espèce	<i>Trigonella gladiata</i>

II-1-5 -Morphologie de la plante

Fleurs sur des pédoncules allongés qui en générale dépassent les fruits et atteignent (1-3 cm) Gusses par (5-8 cm), réfléchies faiblement arquées de (1-1,5 cm × 2- 2,5 mm), a face fortement réticulés , corolle jaune (2-3) fois plus longue que la calice (Quezel et Santa , 1962)



Figure 2 : *Trigonella gladiata* (Chabbi, 2014)

II-1- 7- Principaux constituants de la plante

Pour qu'un aliment soit reconnu comme un reconstituant majeur ; il faut qu'il contienne en quantité appréciable (10%) les deux principes nutritionnels que sont les protéines et les sucres

Les protéines pour construire des tissus et des muscles et les sucre pour fournir l'énergie nécessaire a cette construction cellulaire

Par sa teneur élevée en protéines ; 29 % et en glucides 57 % .Le fenugrec germé répond bien à ces deux exigences ; seules les graines oléagineuses font mieux par l'apport en lipides (graisses) plus important ; environ 20 à 60% (Marcel Monnier, 2004)

II -2 - *Rhizobium*

II -2 -1-Description

Petites bactéries non sporulées hétérotrophe ; se développe bien dans le sol et en générale sont présentes dans la terre cultivées (Obaton et *al* ,1983) .

II -2 -2-Principales caractéristiques

Les rhizobia sont des bactéries asporulées ; aérobie anaérobie facultatif (pelmon ,1993) se sont des microorganismes typiquement Gram négatif ; très mobiles quand elles sont jeunes elles se présentes en cocobacilles ou en bâtonnets (Jordon , 1984 , Bekki ,1983) de 0.6 a 0.8 μm de large sur 1 a 4 μm de long , rencontrés dans le sol sous forme libre ou en bactériodes a l'intérieur des nodosités (Dommergue et Mangenot , 1970 , Vincent et *al*

,1977). La morphologie de la bactérie est très voisine quelque soit l'espèce (Vincent et al ,1977).

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

II -2 -3-Taxonomie des rhizobiums

Les rhizobia furent isolés pour la première fois par *Beijerinck* qui nomma la bactérie qu'il isola *Bacillus radicolica*. Ces bactéries furent par la suite renommée *Rhizobium* (Sahgal et Johri , 2003) la premier classification des rhizobia a été réalisée sur la base des groupes d'inoculation croisée ; elle comportait un seul genre ; le genre *Rhizobium* avec six espèces : *R. leguminosarum* ; *R. meliloti* ; *R. trifolii* ; *R. phaseoli* ; *R. lupiniet R. japonicum*. (Zakhia et al , 2001 , Sahgal et johri , 2003)

Sur la base de la vitesse de croissance in vitro ; les rhizobium ont été ensuite reclassés en deux groupes : groupe des bactéries a croissance rapide et celui des bactéries a croissance lente. les deux groupes faisaient toujours partie du genre *Rhizobium* (Sahgal et Johri , 2003) en 1982 Jordan sépara les deux groupes dans deux genres : le genre *Rhizobium* correspondant aux souches a croissance rapide et le nouveau genre ; *Bradyrhizobium* ; pour les souches a croissance lente

Selon la classification actuelle (**tableau 1**). Les rhizobia, ou BNL, forment un groupe de bactéries qui sont caractérisées par une diversité génétique et une hétérogénéité physiologique très importantes (Rice et al, 1994 ; Parker 2002) en effet ; des bactéries appartenant a différents genres et classes taxonomiques sont actuellement connues pour les capacité symbiotique. ainsi les genres *Rhizobium* ; *Sinorhizobium* ; *Mesorhizobium* ; *Ochrobactrum* ; *Allorhizobium* ; *Azorhizobium* ; *Methylobacterium* ; *Bradyrhizobium* ; *Blastobacter* ; *Devosia* (classe des α -protéobactéries) ; *Burkholderia* et *Ralstonia* (classe des β protéobactéries) (Garrity et al , 2004) ainsi que certaines protéobactéries (Benhizia et al , 2004) forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuses (Weir , 2006)

Tableau1 : Les derniers remaniements de la classification des rhizobia selon Weir,2014

	Espèces	Source d'isolation	Références
Class: <i>Alphaproteobacteria</i> Order: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i> Genre: <i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>		Frank B et al., 1889
	<i>symbiovar viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>	Frank B et al., 1889; Jordan DC et al., 1982
	<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Jordan DC et al., 1982; Renan A et al., 2012
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank B et al., 1889; Jordan DC et al., 1982
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>	Terefework Z et al., 1998; Lindström K et al., 1989
	<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström K et al., 1989
	<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>	Martinez-Romero E et al., 1991
	<i>R. leucaenae</i>		Renan A et al., 2012
	<i>R. tropici</i>		Martinez-Romero E et al., 1991
	<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	López LA et al., 2010
	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
	<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian CF et al., 2008
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>	Segovia L et al., 1993
	<i>symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	Wang LX et al., 1999
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	Souza V et al., 1994
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie P et al., 1998	

	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger N et al., 1997
	<i>symbiovar phaseoli</i>		
	<i>symbiovar gallicum</i>		
	<i>R. giardinii</i>		
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
	<i>symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>	Chen WX et al., 1988
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang ET et al., 1998
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>	Van Berkum P et al., 1998
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>	Tan ZY et al., 2001
	<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Bouzar HD et al., 2001
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp</i>	Wei GH et al., 2002
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>	Squartini A et al., 2002
	<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	Wei GH et al., 2003
	<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Populus alba</i>	Garcia-Fraile P et al., 2007
	<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	Gu CT et al., 2008
	<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>	Han TX et al., 2008
	<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	Peng G et al., 2008
	<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Ramirez-Bahena MH et al., 2008
	<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>	Lin DX et al., 2008
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berge O et al., 2009	
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu YL et al., 2009	

	<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	Hou BC et al., 2009
	<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	El Akhal MR et al., 2008.
	<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>	Hou BC et al., 2009
	<i>R. radiobacter</i>	*	Young JM et al., 2001
	<i>R. rhizogenes</i>	*	
	<i>R. rubi</i>	*	
	<i>R. vitis</i>	*	
	<i>R. nepotum</i>	*	Pulawska J et al., 2012
Genus: <i>Ensifer</i>	<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Dangeard PA 1926.
	<i>E. fredii</i>		
	<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>	Scholla MH and Elkan GH 1984
	<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>	Chen WX et al., 1988
	<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>	de Lajudie P et al., 1994
	<i>E. terangaie</i>	<i>Different host plants</i>	
	<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>	Young JM et al., 2001
	<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>	Lorquin J et al., 1997
	<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>	Rome S et al., 1996
	<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick G et al., 1999
	<i>E. kostiense</i>		
	<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>)	<i>Glycine max</i>	Chen WX, Yan GH, Li J 1988
	<i>E. adhaerens</i>	*	Casida LEJ 1982
	<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>	Wei GH et al., 2002

	<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Toledo I et al., 2003
	<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret L et al., 2007
	<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>	Merabet C et al., 2010
Genus: <i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Lin DX et al., 2008
Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>	Jarvis BDW et al., 1982
Genus: <i>Mesorhizobium</i>	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen H et al., 1991
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour SM et al., 1994
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Jarvis BDW et al., 1997
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour SM et al., 1995
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>	de Lajudie P et al., 1998
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang ET et al., 1999
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velásquez, E et al., 2001
	<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao JL et al., 2004
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	
	<i>M. thiogangeticum</i>	*	
	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang FQ et al., 2007
	<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	Guan SH et al., 2008
	<i>M. gobiense</i>	<i>Wild legumes</i>	Han TX et al., 2008
	<i>M. tarimense</i>		

	<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al., 2009
	<i>M. opportunistum</i>		
	<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal C et al., 2009
	<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>	Chen WM et al., 2011
	<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>	
	<i>M. abyssinicae</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Degefu T et al., 2013
	<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang JJ et al., 2012
	<i>M. hawassense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Degefu T et al., 2013
	<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng WT et al., 2013
	<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou PF et al., 2010
	<i>M. shonense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Chen H et al., 1991
	<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana species</i>	Lu YL et al., 2009
	<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus species</i>	Zhao CT et al., 2012
	<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>	Ramirez-Bahena MH et al., 2012
Genus: <i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde A et al., 2005

Famille: <i>Methylobacteriaceae</i> Genus: <i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>	Jourand P et al., 2004
Genus: <i>Microvirga</i>	<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus sp.</i>	Ardley JK et al., 2012
	<i>M. lotononidis</i>	<i>Different legume host</i>	
	<i>M. zambiensis</i>		
Famille: <i>Brucellaceae</i> Genus: <i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i>	Zurdo-Piñeiro JL et al., 2007
	<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trujillo ME et al., 2005
Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i> Genus: <i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus B et al., 1988
	<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira FMS et al., 2006
	<i>A. oxalatophilum</i>		Lang E et al., 2013
Genus: <i>Devosia</i>	<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas R et al., 2003
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i> Genus: <i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Jordan DC 1984 ; Jordan DC et al., 1982
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	KuyKendall LD et al., 1992
	<i>B. liaoningense</i>		Xu LM et al 1995
	<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	Yao ZY et al., 2002
	<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>	Rivas R et al., 2004
	<i>B. canariense</i>	<i>Genisteeae et Loteae</i>	Vinuesa P et al., 2005
	<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>	Islam MS et al., 2008
	<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramirez-Bahana MH et al., 2009

	<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Islam MS et al., 2008
	<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>	Zhang YM et al., 2012
	<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahbourne R et al., 2011
	<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	Wang JY et al., 2013
	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	Van Berkum P et al., 2006
	<i>B. oligotrophicum</i>		Ramirez-Bahana MH et al., 2013
	<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	
Class: <i>Beta Proeobacteria</i>			
Order: <i>Burkholderiales</i>			Van Berkum P, Eardly BD 2002
Famille: <i>Burkholderiaceae</i>			
Genus: <i>Burkholderia</i>			
		<i>Vertisol microaggregates</i>	Achouak W et al., 1999
	<i>B. caribensis</i>		
	<i>C. taiwanensis</i> <i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	Moulin L et al., 2001
	<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</i>	Vandamme P et al., 2003
	<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	
	<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i> , <i>Mimosa scabrella</i>	Chen WM et al., 2007
	<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Chen WM et al., 2008
	<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Chen WM et al., 2003
	<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Partida-Martinez LP et al., 2007
	<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Sheu SY et al., 2013

	<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Partida-Martinez LP et al., 2007
	<i>B. heleaia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>	Aizawa T et al., 2010
	<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp.</i>	SHEU(S.Y.) et al., 2012
Genus: <i>Cupriavidus</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>		
	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa sp.</i>	VandammeP, Coeyene T 2004
Class: <i>Gamma-Proteobacteria</i> Order: <i>Pseudomonadales</i> Famille: <i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Shiraishi A et al, 2010

* : Espèces ne parviennent pas à noduler incluses traditionnellement dans les *rhizobium*

III-Nodulation

III-1-Mécanisme de la nodulation

La symbiose chez les rhizobia se traduit par l'induction de la formation de nodosités sur les racines ou les tiges des légumineuses. la nodulation commence quand les racines initient un dialogue moléculaire avec des rhizobia compatibles du sol. La plupart des rhizobia répliquent en sécrétant des facteurs de nodulation lipochitoooligosaccharidiques qui leur permettent d'entrer dans la légumineuse. l'échange moléculaire est continu; ce qui permet dans les interactions compatibles aux rhizobia d'envahir les cellules racinaires corticales ; de se différencier en bactéroïdes et de la fixer l'azote (Deakin et Broughton, 2009)

Du point de vue physiologique et selon Dénarié et Cullimore (1993) ; Dénarié et al, (1996) ; Parniske et Downie (2003) : plusieurs composés dérivés des plantes et des bactéries jouent un rôle crucial dans l'établissement de l'association symbiotique.

Les flavonoides libérés par les légumineuses et les lipochitoooligosaccharides ou facteurs de nodulation (facteur nod) secrétés par les rhizobia sont les deux principaux signaux moléculaires impliqués dans l'établissement de la symbiose ; il existe cependant d'autres composants tels que les exopolysaccharides (EPS) ; lipopolysaccharides (LPS) attachés a la membrane bactérienne ; les β - glucanes cycliques et les protéines externes de nodulation (nodulation outer proteins : NOPs) qui jouent un rôle intégral dans la formation nodulaire. cette pléthore de facteurs Nods : LPS, EPS et NOPs associée avec une nodulation effective sur différentes plantes légumineuses indique qu'il y a une combinaison spécifique de ces signaux chimiques qui permet l'union finale de la bactérie avec la plante.

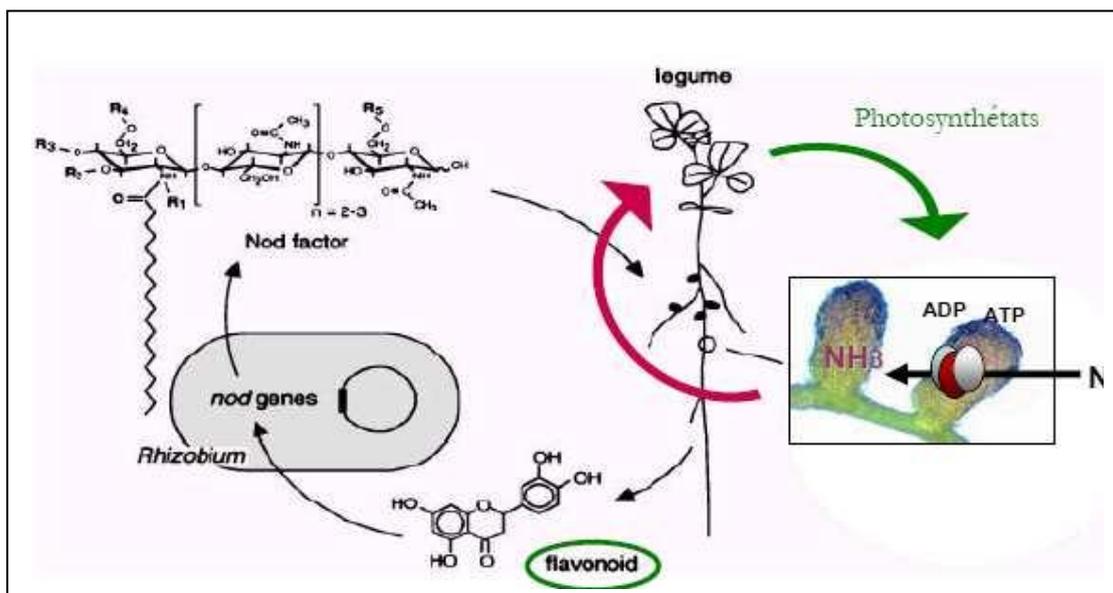


Figure 3 : Dialogue moléculaire de la symbiose légumineuse-rhizobium (Raseberg, 1997)

Concrètement ; la contribution de la plante au dialogue commence par la sécrétion des flavonoïdes dans la rhizosphère (Redmond et al, 1986) ces métabolites secondaires agissent conjointement avec le produit rhizobien exprimé constitutionnellement : le nodD qui est un activateur transcriptionnel de multiples gènes de nodulation avec les abréviations suivantes : nod , nol , et noe. du moment que le NodD se combine aux signaux flavonoïdes a partir de légumineuses spécifiques et potentielles seulement ; ils servent aussi a la détermination du spectre d'hôte

III-1-1- Formation des bactéroïde

Les bactéries provoquent la formation de nodosités sur les racines en pénétrant par les poils racinaires ; et se transforment en bacteroides de plus grande taille . les nodosités sont le siège d'une activité symbiotique dans laquelle la plante fournit les sucres et l'énergie issus de la photosynthèse ; et bénéficie en retour des acides aminés qui y sont produits

III-1-2- Les étapes de la nodulation

III-1-2- 1- Préinfection

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka et al, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances de type flavonoïdes et isoflavonoïdes, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape et al., 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado et al., 1995).

Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes nod bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod , des lipochitoooligosaccharides (Perret et al, 2000).

Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte ; La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures ; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui enferme les *Rhizobium* (Wais et al, 2002). Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules (Timmers et al, 2007) ; plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Wood et Newcomb, 1989).

III-1-2- 2- L'infection

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée . La croissance des nodosités se poursuit dans les

régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité (Rasanen, 2002).

III-1-2- 3- Développement du nodule

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi, 2000). Les nodules de type indéterminé (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe.

La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules.

Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée. Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers et al, 1999).

De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de préinfection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel et al, 1992).

Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation. L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudonodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule.

De plus, les facteurs Nod produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante. Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus mais il semble que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine (Mathesius et al, 1998 ; Boot et al, 1999) et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Mathesius et al, 2000).

III-3-Génétique de la Fixation

Pour entamer cette symbiose, on décrit les gènes impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote.

Gène sym : gènes nécessaires à la formation de nodosités symbiotiques fonctionnelles fixant l'azote.

Gène nod : gènes nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités, d'autres gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités : les gènes *nol* et *noe*.

Gène fix : gènes nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote.

Gène nif : gènes codant pour les trois sous-unités hautement conservées de la nitrogénase (réduisant l'azote moléculaire en ammoniac), ainsi que pour des protéines auxiliaires nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Ces gènes symbiotiques sont induits seulement lorsque les bactéroïdes peuvent fixer l'azote, c'est-à-dire quand la bactérie peut noduler la plante. (Dénarié et al, 1996)

CHAPITRE 02

Matériel et Méthodes

I - Isolement des bactéries nodulants de la plante *Trigonella gladiata*

Les nodules ont été obtenus à partir de la plante *Trigonella gladiata* dans la région de (El-Mahmel) wilaya de kenchla (Latitude 35°26'08" Nord Longitude 7°08'35" Est) où la plante pousse de manière spontanée (sauvage).



Figure 4 : Localisation géographique de la zone de prélèvements

I-1-Collecte des nodules

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

La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck et al ., 1993). Une creusée d'environ 15cm au tour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire ; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ; couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.

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

I -2-Conservation des nodules

La méthode de conservation utilisée est celle décrite par Vincent (1970) qui repose sur la dessiccation des nodules dans des flacons adéquats contenant du Chlorure de Calcium anhydre (CaCl_2) (Figure 5). Par cette méthode les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois.

Chaque flacon sera identifié par une étiquette portant les informations suivantes :

- Le nom de la plante hôte,
- Le lieu et date de prélèvement;
- La date de conservation.
- Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h.

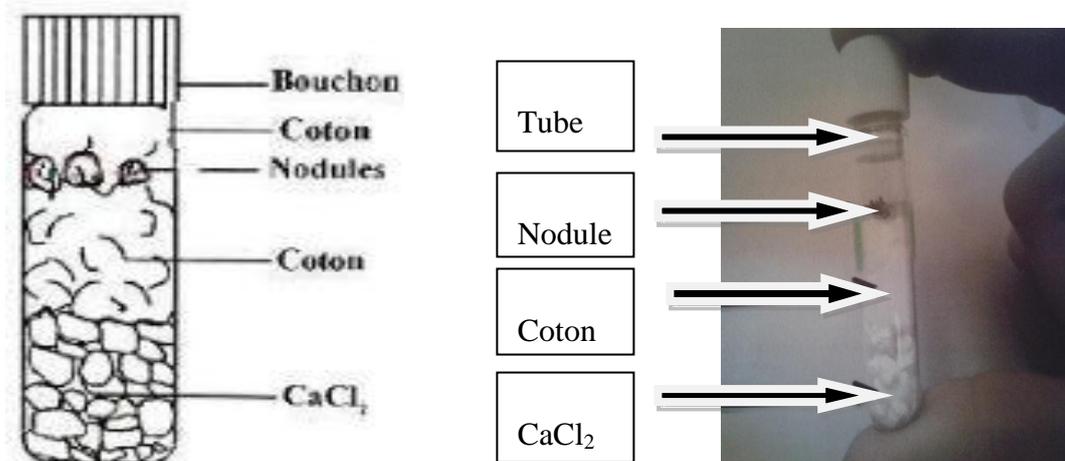


Figure 5 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

I -3- Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau au réfrigérateur toute une nuit. Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol absolu puis transférés dans une solution Hypochlorite de Sodium 3% (p/v) pendant 3 minutes, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent,1970).

I -4 Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé

sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le Yeast-Mannitol-Agar YMA (Vincent., 1970) additionné de rouge Congo.

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser (figure 6). Les jus des mêmes nodules sont ensemencés sur une boîte de Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA au BCP). Les boîtes sont incubées trois jours à 28°C (Annexe1).

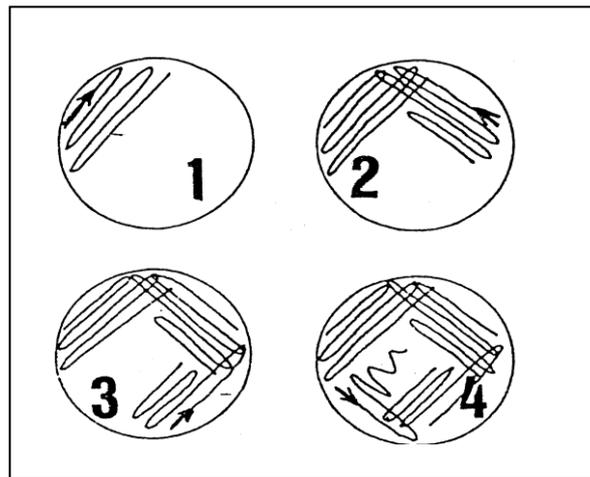


Figure 6 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

II- Caractères cultureux

II -1 Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale. 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: (Annexe 1)

Milieu liquide : -YMB (Yeast Manitol Broth)

Milieux solides : -YMA (Yeast Manitol Agar)

-YMA + RC (Yeast Manitol Agar)

-YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Blue)

- GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

II -2 Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994) ; des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification. La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis les placer dans un bain-marie agitateur (120 tours/ min) à 28°C. Quand le bouillant est troublé, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique sont enfin réalisés.

II -3- Examen microscopique

II -3-1 Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram - (Annexe2)

II -4- Conservation des souches

Avant de conserver les souches elles sont ensemencées dans des tubes contenant 9ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h dans un bain-marie avec agitation à une température de 28°C. Le choix d'un procédé assurant la parfaite stabilité des microorganismes et leur survie prolongée dépend :

- de la nature de microorganisme à conserver.
- des besoins du laboratoire et de ses moyens.

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

- La première est la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 28°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent ,1970).

- La deuxième méthode est la conservation sur YMA additionné 30% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes Eppendorf pendant 48h d'incubation à 28°C, puis mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à -20°C .

III- Caractérisation phénotypiques des isolats

III -1-Testes biochimique

III -1-1 -Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Annex) (Behringer, 1974) contenant 0,1% de KNO₃ (p/v) à 28°C pendant 4 jours après incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique) et nitrate 2 (⇒-naphtylamine dans l'acide acétique). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites.

Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de poudre de zinc et observer après quelques minutes la teinte obtenue.

III -1-2- Activité cellulosique

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode du rouge Congo de Teather et Wood (1982), composé capable de se lier de manière stable à une molécule non dégradable de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC).

Les souches sont mises en culture pendant 5 jours sur le milieu YMA contenant 0,25% (p/v) de CMC. Après incubation à 28°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 28°C.

La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1M ; les boîtes sont ensuite laissées à une température ambiante puis vidées.

Si le fond de la boîte présente un halo jaune-orangé autour des colonies, on note la présence de l'enzyme endoglucanase chez les souches.

III -1-3- Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et souches témoins sont cultivées sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH et incubé à 28 °C pendant 48 heures.

La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,45µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C.

III -2- Testes physiologiques

III -2-1- Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mis en culture sur le milieu TYA et incubées à différentes températures : 4°C, 28°C, 37°C et 44°C.

III -2-2-Effet de pH

On ensemence sur des bouillons TYB ajustés à des différents pH : (3, 4 , 5,5 , 6,8 , 8 et 10) . La DO est mesuré après 24h d'incubation à 600 nm

III -2-3-Tolérance au NaCl

les isolat et les souches témoins sont ensemencés dans des tubes de 5ml du milieu TYB avec différentes concentration de chlorure de sodium NaCl : (0,1% , 1% , 2% , 3% , 5% et 10%).

Incubation à 28°C avec agitation pendant 24h.

Mesurer la DO à 600 nm.

CHAPITRE 03

Résultat et discussion

I -Caractères cultureux

Tableau 2 : isolats et souches de références utilisés.

Code des souches	Souches	Plante-hôte	Origine Géographique	Source
T	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv trifolii</i>			
F	<i>Rhizobium sulae</i> RHF	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine Algérie	A.Benguedouar Constantine
Méso	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine Algérie	S.Dakiche Constantine
TN1	isolat	<i>Trigonella gladiata</i>	Khenchla Algérie	Note étude
TN2	isolat	<i>Trigonella gladiata</i>	Khenchla Algérie	Note étude
TN3	isolat	<i>Trigonella gladiata</i>	Khenchla Algérie	Note étude

- Croissance sur YMA+ Rouge Congo et GPA

Après 48h d'incubation de YMA+ Rouge Congo on observe des colonies lisses , visqueuses, avec une couleur translucide généralement elles n'absorbent pas le Rouge de Congo et restent blanches rarement rose (Figure 7)

Les colonies typiques aux rhizobia absorbent faiblement le rouge Congo (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994) par rapport aux contaminants ou les souches occupant le nodule sans fixation de l'azote

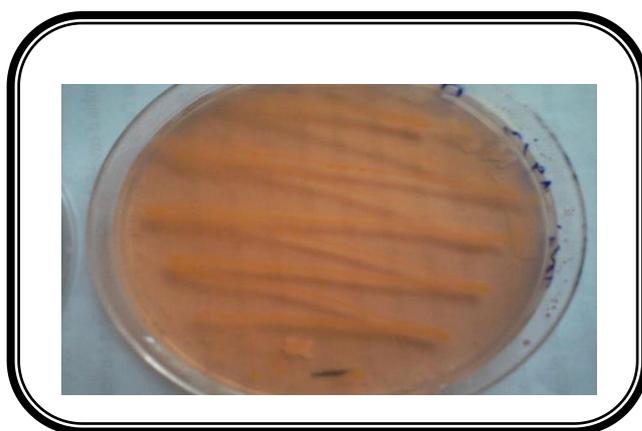


Figure 7 : Croissance sur YMA+RC

- Sur le milieu GPA ; le développement des bactéries se fait sans acidification du milieu après 24 heures chez toutes les souches de références et les isolats (Figure 8)



Figure 8 : Croissance des bactéries sur milieu GPA

- Croissance sur YMA

La croissance sur milieu YMA est détectable après 24 heures ; les colonies des isolats TN1 ; TN2 ; TN3 typiques sont lisses, brillantes ; translucides avec une consistance visqueuse et couleur blanchâtre (Figure 9)



Figure 9 : la croissance sur YMA

- Vitesse de croissance

Après 24 à 48h d'incubation ; on note l'apparition des colonies sur le milieu YMA+BTB avec un virage de couleur du milieu vers le jaune, indiquant une production d'acide révélée par l'indicateur de pH chez les isolats: TN1, TN2, TN3, aussi que les souches de référence T, N et Méso, ce qui confirme que nos isolats sont à croissance rapide (Figure 10)

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes changer la coloration verte du milieu YMA+BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture. (Jordan, 1984 ; Beck et *al*, 1993).

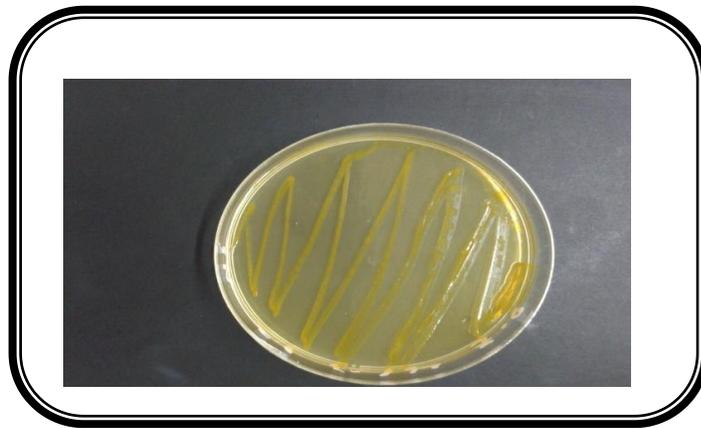


Figure 10: Acidification du milieu YMA+BTB (Après 24h)

I -1-Examen microscopique

L'observation microscopique montre des cellules bâtonnets courts à extrémités arrondies ; Gram négatif. (Figure 11)



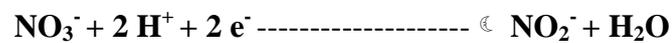
Figure 11 : Coloration de Gram [G : × 100]

II - Caractérisation phénotypique des bactéries

II -1 Tests biochimique

II -1-1- Réduction des nitrates

Après 4 jours d'incubation l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs 1 et 2 de la nitrate réductase a montré un virage de la couleur du milieu au rose clair ou rouge chez tous les isolats et la souche de référence (Figure 12) ce qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrite.



Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (El-Hilali, 2006). La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin *et al.*, 2006).

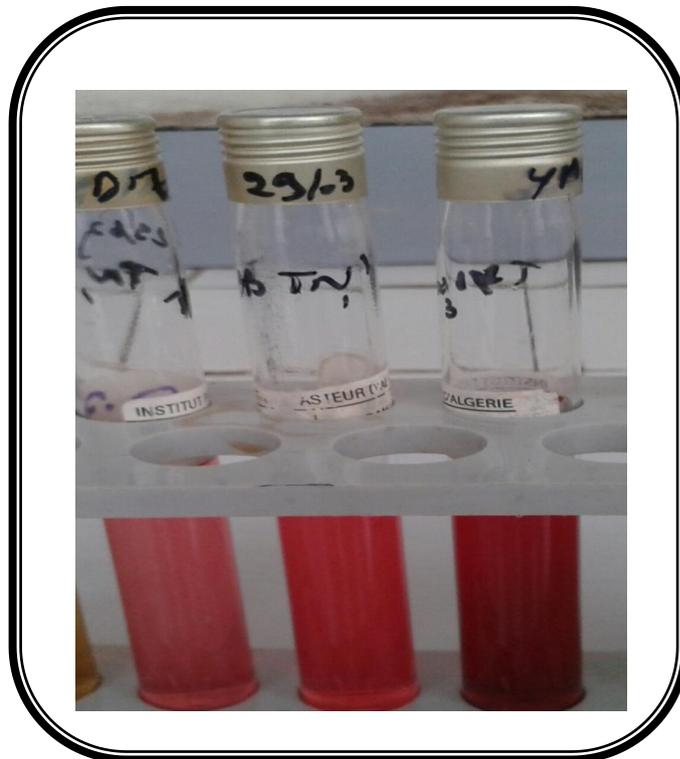


Figure 12 : Test de la nitrate réductase

II -1-2- Hydrolyse de l'urée

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

L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée et la libération des ions d'ammonium ; se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rose foncé.



Après une incubation pendant 48 heures. Parmi les isolats, seul N₁ a donné un résultat positif vis-à-vis de l'hydrolyse de l'urée en alcalinisant le milieu de culture par le virage de couleur rouge de phénol de l'Orangé au rouge violacé (rose fuchsia) (Figure14) ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium.

Donc nos souches de références et l'isolat TN1 ont l'enzyme d'uréase ; par contre les isolats TN2 ; TN3 acidifier le milieu et donne un virage de couleur de rouge vers le jaune (Uréase -) (Figure13)

L'enzyme peut être « constitutive », c'est-à-dire présente dans la bactérie indépendamment de celle de l'urée : l'enzyme sera révélée rapidement (quelque minutes à deux heures). Pour d'autres bactéries, la synthèse est induite par l'urée et la révélation peut donc demander plus de temps (Joffin *et al.*, 2006)

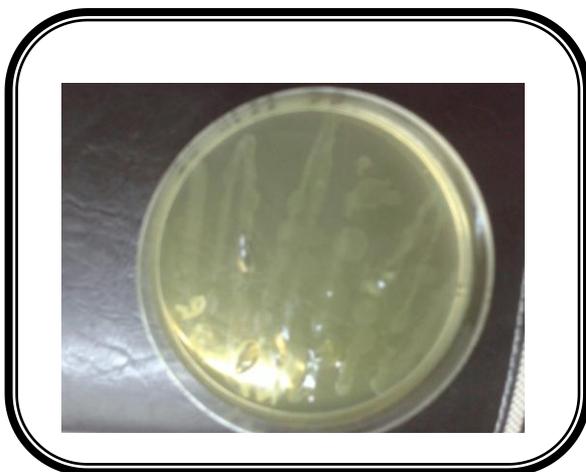


Figure 13 : Test d'uréase négatif (-)



Figure14 : Test d'uréase positif (+) (TN1)

II-1-3- Activités cellulosiques

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose, l'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies indique la présence d'une endoglucanase (cellulase) (Lindeström et Lehtomak, 1988).

Presque tous les isolats TN1, TN2 et TN3 ont présenté une réaction positive (Figure 15) sauf les souches de références *T*, *F* et *Méso* qui ont donné un résultat négatif (Figure 16).

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



Figure15: Test de cellulase positif (+)



Figure16 : Test de cellulase négatif (-) (F)

II -2- Testes physiologiques

II -2-1- Tolérance au NaCl

les effets du NaCl semblent être un bon indicateur de la réponse des rhizobium aux conditions de salinité différentes (Diez *et al.*, 2009).

La croissance des souches bactériennes à des concentrations de NaCl, variant de 0.1% à 5% après 24h d'incubation, a été positive cependant aucune croissance n'a été observée à 10% de NaCl le même cas est observé pour nos souche témoins (*T*, *F*, *Méso*). Ces résultats montrent que l'optimum de croissance de nos isolats est compris entre 1% et 3% (Figure 17).

La limite de tolérance à la similarité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce (Kassem, *et al.*, 1985).

Boncompani *et al* (1999); Guoffi *et al* (1999) ont montré que pour s'adapter à une forte concentration en sel plusieurs espèces des bactéries fixatrices d'azote augmentent leur taux de solutés organiques, de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs tel que les acides aminés comme la proline, la glycine-bétaine (et dérivé), la lectoine et le glutamate ou des hydrate de carbone comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par la forte salinité.

Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont très affectés par le stress salin qui affecte à la fois les populations rhizobiennes, la légumineuse-hôte et la relation symbiotique. L'initiation nodulaire est extrêmement sensible au NaCl par réduction des sites d'infection de la racine et du nombre des poils racinaires (Zohran et Sprent, 1986).

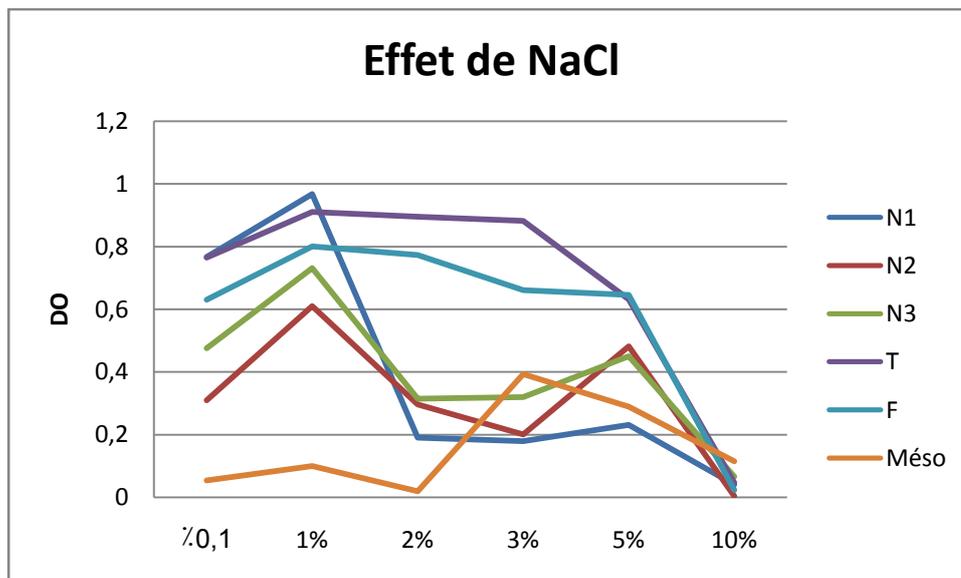


Figure17 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches étudiées.

II -2-2- Effet de la température

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YMA, les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 4°C jusqu'à 37°C avec un optimum de croissance entre 28 et 37°C

- À 4°C, tous les isolats ont montré une bonne croissance après 10 jours d'incubation.

L'incubation de nos isolats et les souches de références à 44°C pendant 10 jours montre que tous nos isolats et souches de références peuvent croître avec une faible croissance

Les souches qui résistent à températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique, cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räzänen, 2002).

Tableau 3 : Croissance des isolats et souches de référence à différent température

	4°C	28°C	37°C	44°C
T	-	+(2j)	+	-
F	+(3j)	++	++	+(3j)
Méso	+(3j)	+	++	-
TN1	+(2j)	++	++	+
TN2	+(4j)	++	++	-
TN3	+(4j)	++	++	+

II-2-3- Effet du pH

Il ressort du test de l'effet du pH sur la croissance et le développement des isolats que la majorité des souches sont capable de pousser entre pH 3 et pH 10 avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant entre pH 6.8 et 8.

Aussi Küçük et Kivanç (2008) ont trouvé que les souches qui nodule la légumineuse sont capable de vivre aux variations du pH de 3 à 10 (Figure 18).

Dans le milieu alcalin ou la valeur de pH est 10, on observe une tolérance chez les isolats après 24h d'incubation ; cette extension de tolérance en fonction du temps est peu due à une adaptation des isolats et souches de références a pH alcalin.

Donc on peu dire que nos isolats et souche de références peuvent pousser sur le milieu alcalin ou acide grâce à un système d'adaptation (l'exclusion et/ ou l'extrusion des protons) .

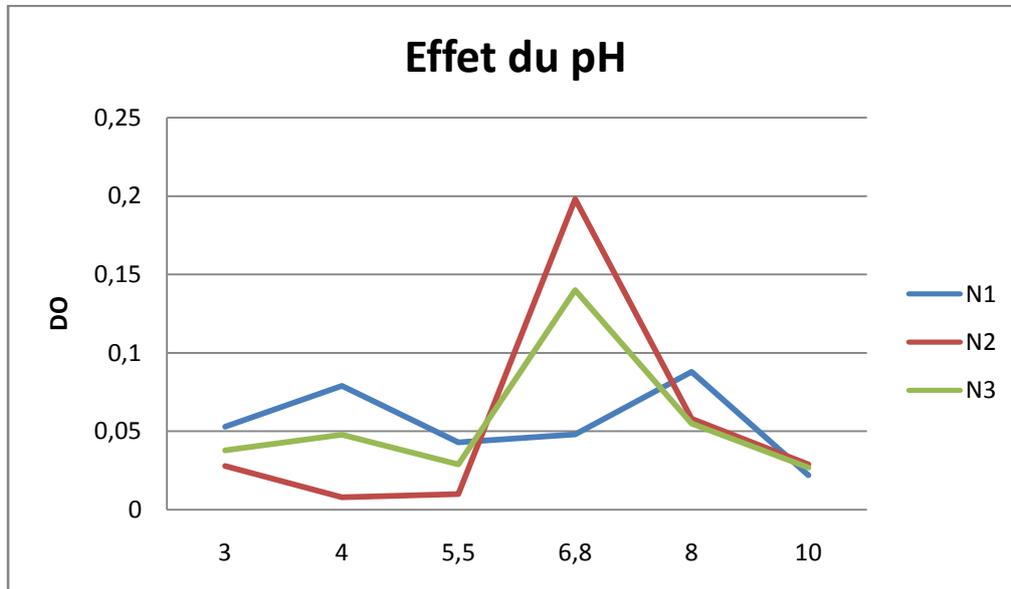


Figure18 : Effet du pH sur la croissance des isolats T= 24h

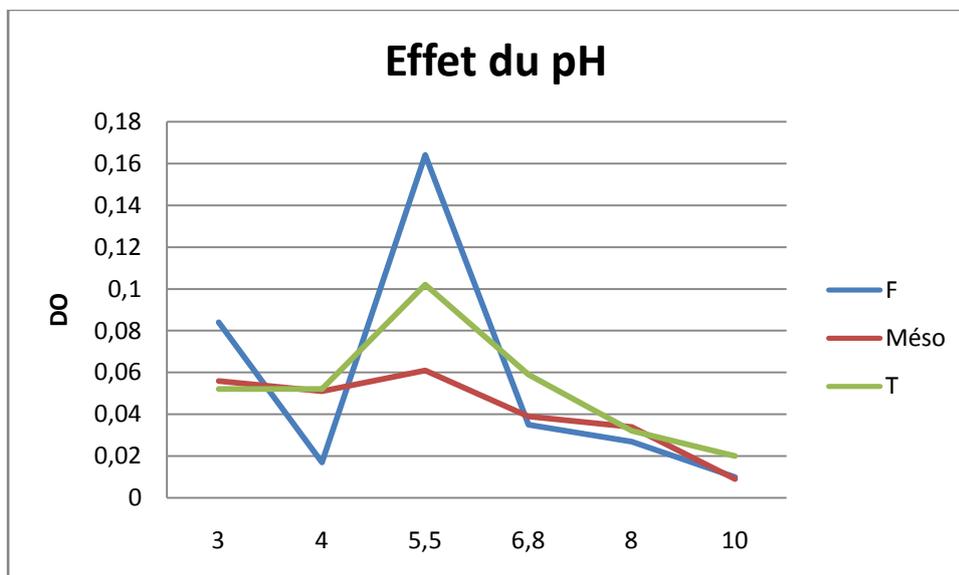


Figure18 : Effet du pH sur la croissance des souches de références (t=24h)

CONCLUSION

Conclusion :

L'association symbiotique fixatrice d'azote sont très diversifiées et sont responsable de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire de globe ; les plus connues et les mieux étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses et en limitant les engrais azoté qui sont couteux et polluants

Dans cette étude nous avons identifier des bactéries isolées à partir des nodules de l'espèce *Trigonella gladiata* puis caractériser en présence de trois souches de référence : T , N et Méso Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux rhizobia (selon Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994, Jordan, 1984).

A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées de la légumineuse *Trigonella gladiata* ont le même aspect morphologique et microscopique (des bacilles Gram négatif) que les souches de référence (souches appartenant au rhizobia).

En effet toutes les souches ont une croissance rapide sur le milieu YMA additionné de bleu de bromothymol , une faible absorption de rouge congo , et le développement des bactéries se fait sans acidification sur le milieu .

Les études phénotypiques, notamment la morphologie des colonies sur YMA, GPA, la vitesse de croissance, et la présence des enzymes spécifique au processus de nodulation, nous font supposes que les isolats correspondent à une description du genre *Rhizobium*.

L'étude des facteurs abiotiques (NaCl, pH et température) fait ressortir que :

Les souches testées peuvent pousser dans un large intervalle de température compris entre 4°C et 44°C avec une température optimale de croissance entre 28°C et 37°C qui confirment une grande variabilité de la thermo-tolérance

Les souches isolées des racines de la Légumineuse *Trigonnella gladiata* et les souches de références tolèrent des concentrations relativement élevées en NaCl (jusqu'à 10 %), Cette tolérance s'explique le plus souvent par la présence de molécules osmoprotectrices dans les cellules bactériennes (Nour et *al.* 1995).

Les souches sont capables également de pousser sur une large gamme de pH allant de 3 à 10 avec un pH optimum de croissance entre 5 et 6 .

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base génétique pour les travaux ultérieurs. Sur le plan appliqué, on peut noter :

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

Allen, O. N. and Allen, E.K 1981. *The leguminosae* : a source book of characteristics, uses, and nodulation., The University of Wisconsin Press, Madison, WI.

Barabaut Robert, 2009. *Ecologie Générale : structure et fonctionnement de la biosphère*, 5ème édition, p32, ed. Dunod

Bekki A., 1983 .*contribution à l'étude de quelque espèces de luzerne et leur symbiotes dans un environnement salé.*des biologie végétale. Oran. Université d'Oran .48P

.Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993. *Practical Rhizobium-Legume Technology* Manual. ICARDA. Syria

Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A., Squartini A., 2004:Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System Appl Microbial.* 27 pp 462-468.

Beringer J. E. 1974. *R factor transfer in Rhizobium leguminosarum.* *J. Genet. Microbiol* 84, 188-198.

Boncompagni E., M. Osteras, M.C. Poggi, and D. Le Rudulier. 1999. *Occurence of chomine and glycine betaine uptake and metabolisme in the family of rhizobiaceae and their roles in omoprotection.* *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2072-2077.

Boual ., 2009. *Contribution à l'étude des polysaccharides de quelque plantes spontanées à caractère médicinal*, Mémoire Magister :Biochimie et Analyse bio-produit. Université Kasdi Merbah Ouargla.106 P

Boot., 1999 rédiger par Bouras., 2009. *Les rhizobiums associés aux pois chiche (cicer arietinum)*, Mémoire de Magister : Biotechnologie. Université d'Oran Es Senia.169P

Broughton, W. J. 1983. *Legumes. Nitrogen fixation*, Oxford Universtity Press. 3: 339.

Coronado C, Zuanazzi J, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A et Ratet P 1995 .*Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated.* *Plant Physiol.* 108 pp 533-542.

Denarie, J., Debelle, F., and Prome, J.C. 1996. *Rhizobium lipo-chitooligosaccharide Nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis.* *Annu Rev Biochem* **65**, 503-535.

Denarié, J., Parniske, F., and Rosenberg, C. 2003.*Signaling and Host Range Variation in nodulation.* *Annual Review of Microbiology* **46**, 497-531.

De Faria SM ,lewis GP,Sprent JI, Sutherland JM 1989. *Occrence of nodulation in the leguminosae.**New Physiologist*,111,607-619

Dommergues, Y. R., and Bosco, M. (1998). *The contribution of N₂ fixing trees to soil productivity and rehabilitation in tropical, subtropical and mediterranea regions.* *Microbial interactions in agriculture and forestry.* SubbaRao N. S. and Dommergues Y. R, Oxford & illH Publishing: 65-95.

Domergues et Mangenot ., 1970 . *Ecologie microbienne du sol.* Masson et Cie, Editeurs .120, boulevard Saint-Germain, PARIS Vie.

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 Agadar. Rabat. Maroc.

Elkan G.H.1992. taxonomy of rhizobia . Canadian journal of Microbiology,38:446 -450.

De Faria SM ,Lewis GP,Sprent JI, Sutherland JM 1989. *Occrence of nodulation in the leguminosae.* New Physiologist,111,607-619

Deakin et Brought.,2009. rédigé par Khireddine ,H.,2012. *Comprimés de poudre de dates comme support universel des principes actif de quelques plantes médicinales.* Mémoire de magister .Technologie alimentaire. Université M'hamed Bougara Boumerdes

Diez,B.,Fajardo,S.,Puertas-Mejia,M .A.,del Rosario de Felipe,M.et Fernandez-Pascual,M.(2009). *Stress tolerance , genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain.* Arch Microbiol.191:35-46

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 Agadar. Rabat. Maroc

Fang,Y ., Hirsch AM 1998. *Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa.* Plant Physiol. **116:** 53-68.

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

Garrity.,2004. *Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions.* Can. J. Microbiol. **38,** 475-484.

Ghalem.,2008 . *Contribution à l'étude du développement de la culture du soja .* Mémoire de Magister : Exploitation des interactions plantes-microorganismes. Université d'Oran.137P

Guoffi E.K, Witter E, et MC Grath S.P., 1999. *toxicity of heavy metals to microorganisms and microbia processes in agriculture soil* : areviw.soil.biochem.30: 1389-1414.

Gustave , Heuzé ., 1861. Livre Les plante fourragères .*Fenugrec*.437P.

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

Ibekwe, A. M., J. S. Angle, R. L. Chaney, and P. Vonberkum. 1995. *Enumeration and nitrogen fixation potential of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations.* Agric. Ecosyst. Environ. **61**, 103-111.

Jarvis, B. D. W., P. van Berkum, W. X. Chen, S. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marrel, and M. Gillis. 1997. Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 895-898.

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

Joffin, J.-N et le yral ., G. 2006 . Microbiologie technique, Tome 1 :dictionnaire des techniques, 4^{ème} edition CRDP d'aquitaire.

Jordan D.C., 1984 . *Rhizobiaceae*. In N. R.Krieg and J.G.Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. the Williams & Wilkins, Co., Baltimore. pp 234-245.

Kape R., Parniske M., Werner D., 1991. *Chemotaxis and nod Gene Activity of Bradyrhizobium japonicum in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids.* Appl Environ Microbiol. 57 pp 316-319.

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

Kassem M, Capellano A, et Gounot A.M., 1985. Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'ineffectivité et l'efficience de *Rhizobium meliloti*. MIRCEN J.1 :

Küçük Ç., Kivanç M., 2008: Preliminary characterization of *Rhizobium* strains isolated from chickpea nodules African Journal of Biotechnology Vol. 7 (6), pp. 772-775

Kulkarni S., Surange S.J et Nautiyal C.S 2008. *crossing the limits of rhizobium existence in extreme condition.* curr.Microbiol.41: 204-409P

- Lindemann, W.C. et Glover, C.R. 2003.** Nitrogen Fixation by Legumes. [En ligne]. <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec10/lindemann.html> (page consultée le 30 janvier 2013).
- Lindström, K. And S. Lehtomäki., 1988** – Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. **50**: 277-287
- Madigan M., Martink J., 2007** : Brock Biologie des microorganismes 11^e édition. Edition Person Education France. pp 599-601, 676-681.
- Mathesius U, Charon C, Rolfe BG, Kondorosi A et Crespi M 2000.** Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white
- Martinez-Romero, E., and Caballeromellado, J. 1996.** *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sei.* 15(2): 113-140.
- Marcel, Monnier ., 2004.** Livre Culture des graine germées . *Principaux constituants de la plante.* 115p
- Obaton, M.** 1983. Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobiums*. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* **272**, 2630-2633
- Parker M. A. 2002.** Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium* and *Macroptilium* species in northern Mexico. *Appl. Env. Microbiol.* **68**, 2044-2048.
- Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* **234**, 201-262.
- Pelmont J., 1993:** Bactérie et environnement adaptation physiologique. Edition Office des publication Universitaires. Vol 2
- Perret, X., Parsons, J., Viprey, V., Reichwald, K. and Broughton, W.J. 2000.** Repeated sequences of *Rhizobium* sp NGR234 and *Sinorhizobium meliloti* genomes - A comparative analysis using random sequencing. *Can J Microbiol.* 47(6): 548-558
- Polhill, R. M. and Raven., P.H. 1981.** Advances in legume systematics. *Royal Botanical Gardens, Kew.* **Polhill, R. M., Raven, P.H. and Strirton, C.H. (1981).** Evolution and Systematic of Leguminosae. In: Advances in Legume Systematics (Eds. RM. Polhill and P.P Royal Botanic Gardens: Kew
- Pujic P., Normand P., 2009** : La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofature* 298 pp 26-29.

Quezel P., Santa S., (1962) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France.

Rachie, O. K., 1979. Tropical legumes : resources for the future., National Academy of Sciences. Washington, D.C. RADEVA, G., JURGENS, G., NIEMI, M., NICK, G., SUOMINEN, L. and LINDSTROM

Rasebeg., 1997. Rédigé par boukhatem meriem faiza. thèse de Doctorat en microbiologie. Diversité taxonomique et symbiotique des rhizobia associés aux *Acacia SP.* d'Algérie

Raven., Evert., Eichhorn., 2007 : Biologie végétale. 2^e édition. Edition de boeck. Paris France. pp 653-660.

Räsänen L.A., 2002: Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S., 2002: Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 866-874

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

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994: Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .pp 450.

Tourte Y., Bordonean M., Henry M., 2005: Le monde des végétaux organisatio, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France.

Timmers AC, Auriac MC et Truchet G., 1991- Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium- Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development.* 126: 3617-3628. 1617-1629.

Timmers AC., 2007 difference among cowpea, rhizobia intolerance to high temperature and dissipation in soil. *environ Microbiol.*, 43: 435-439 PP

Teather , G ., and Wood, M., 1982 . Response of Lotus rhizobia to acidity And aluminum in liquid culture and in soil. *Plant Soil.* 107, 227-231.

Vale Matthieu M., (2006) : Quantification et prédiction de la minéralisation nette de l'azote du sol in situ, sous divers pédoclimats et systèmes de culture français, thèse n° 2367, INRA-France

Van Berkum, P., and Eardly, B.D., 1998- The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1132-1136.

Van Brussel AA, Bakhuizen R, Van Sprosen PC, Spaik HP, Tak T et Lugtenberg BJJ., 1992 Induction of preinfection thread structures in the leguminous

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

Wais, G. H., E. T. Wang, Z. Y. Tan, M. E. Zhu, and W. X. Chen. 2002*Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 2231-2239.

Weir, G. H., Z. Y. Tan, M. E. Zhu, E. T. Wang, S. Z. Han, and W. X. Chen. 2006., Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus*

Wood, M., and Newcomb.1989., Response of Lotus rhizobia to acidity And aluminum in liquid culture and in soil. *Plant Soil.* **107**, 227-231

Zahran .,et Sprant J.L,1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum.planta*.167:303-9.

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

Annexe 1 :

Les milieux de cultures et solution utilisés

Le milieu de culture YMB (Vincent,1970).

La composition chimique de ce milieu de culture en g/l d'eau distillée est :

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0,5
MG SO ₄ 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrait de levure	0,5
pH	6,8

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

Le milieu de culture YMA (vincent, 1970)

La composition chimique de ce milieu est :

YMB	1000ml
Agar	18g
pH	6,8

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

Le milieu YMA + RC (vincent, 1970)

La composition chimique de ce milieu est :

Solution stock de Rouge Congo	1ml
YMB	1000ml
Agar	18g
pH	6,8

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

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

Le milieu YMA +BTB (vincent, 1970)

La composition chimique de ce milieu est :

Solution stock de BTB	10ml
YMB	1000ml
Agar	18g
pH	6,8

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

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

Le milieu GPA+BCP (vincent, 1970)

La composition chimique de ce milieu de culture en g/l d'eau distillée est :

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

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

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

Le milieu TYA (vincent, 1970).

La composition chimique de ce milieu de culture en g/l d'eau distillée est :

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0,87
Agar	18
pH	6,8

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

Annexe 2 :

La coloration de Gram

A partir des cultures YMB de chaque souche, on prépare des lames pour la coloration.

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

- Recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- Verser sur la lame la solution iodée et laisser agir pendant 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone.
- Laver à l'eau distillée
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir 1 minute.
- Laver à l'eau distillée.
- Observer au microscope.

Annexe 3

Les tableaux de la mesure de la DO pour différents testent

- Tableau présente la tolérance de Na cl T=24

	0,1%	1%	2%	3%	5%	10%
N1	0,767	0,968	0,191	0,180	0,231	0,41
N2	0,310	0,610	0,296	0,201	0,482	0,004
N3	0,475	0,731	0,314	0,320	0,450	0,066
T	0,765	0,911	0,896	0,882	0,632	0,047
F	0,631	0,801	0,773	0,661	0,646	0,024
M	0,055	0,100	0,020	0,393	0,289	0,116

-Tableau présente l'effets du pH (T₀)

	pH=3	pH=4	pH=5,5	pH=6,8	pH=8	pH=10
N1	0,053	0,079	0,043	0,048	0,088	0,220
N2	0,028	0,008	0,010	0,198	0,058	0,294
N3	0,038	0,048	0,029	0,140	0,055	0,272
T	0,052	0,052	0,102	0,059	0,032	0,020
F	0,084	0,017	0,164	0,035	0,027	0,006
M	0,056	0,051	0,061	0,039	0,034	0,016

-Tableau présente l'effets de la température

	4°C	28°C	37°C	44°C
T	-	+ (2j)	+	-
F	+ (3j)	++	++	+ (3j)
Méso	+ (3j)	+	++	-
TN1	+ (2j)	++	++	+
TN2	+ (4j)	++	++	-
TN3	+ (4j)	++	++	+