



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 de Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا.

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

---

**Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la fève (*Vicia faba*)  
cultivée dans la région de Didouche Mourad à Constantine**

---

Présenté et soutenu par :

Le : 12 /06/2016

*M<sup>elle</sup> AMOURACHE INES*

*M<sup>elle</sup> BELGUECHI NIHED*

**Jury d'évaluation :**

Président du jury : M<sup>me</sup> .R. ALATOU

M.C-UFM Constantine

Rapporteur : M<sup>me</sup> . N. RIAH

M.C- UFM Constantine

Examineur : Mr. Y. BENHIZIA

Professeur -UFM Constantine

*Année universitaire 2015-2016*

## Remerciements

*Nous adressons toute notre gratitude et nos vifs remerciements à M<sup>me</sup>.N. Riah Maître de conférence (B) à l'Université Mentouri Constantine 1 pour le grand honneur d'avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour ses encouragements, son assistance, ses précieux conseils et surtout pour la confiance qu'elle nous a faite durant l'élaboration de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent à M<sup>me</sup>.R. Alatou Maître de conférences (A) à l'Université Mentouri Constantine 1 pour l'honneur qu'elle nous a faite en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Nous remercions Mr. Y. Benhizia Professeur à l'Université Mentouri Constantine 1 d'avoir accepté aimablement de consacrer du temps pour juger ce travail, mais également pour nous avoir accueilli dans le laboratoire de Biotechnologie.*

*Notre immense gratitude va au Professeur Mr. A.Bengudouar pour tous ses conseils, sa précieuse aide, et sa disponibilité.*

*Nous remercions également tous les membres du laboratoire d'écologie microbienne ; M<sup>elle</sup>.Boukaous Leila, M<sup>elle</sup>.Tir Radja, M<sup>elle</sup>.Mellal Hanane et les membres du laboratoire de biologie moléculaire : M<sup>me</sup>.Bouzidi Nadjat et Slougui Sadek. Ainsi que tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers Parents Hacem et Leila, la lumière de mon âme que  
j'aime le plus au monde  
Pour leur encouragement illimité, et pour leurs sacrifices énormes.  
Aucun mot ne serait suffisant pour les remercier.  
Qu'ALLAH les protège et les garde.*

*A mes deux sœurs Mounia et Wissem pour leur grand amour.*

*A mon fiancé Walid pour son encouragement et son soutien.*

*A mes chères amies proches.*

*A mes amies de la promotion 2016 écologie microbienne pour tous les  
beaux moments avec eux.*

*A tous ceux qui me sont chers, A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux  
que j'aime.*

*Amourache Inès*

## *Dédicace*

*En témoignage d'amour et d'affection, je dédie cet humble travail :*

*A mes très chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer ce que je leur dois, pour leur bienveillance, affection et soutien.*

*A mon frère Skander et son épouse Samahir*

*A ma sœur Nesrine et son époux Saïd*

*A mes amies: Sara, Chahra, Hedia, Mouny, Aicha, Amina, Inès,  
Romaïssa, Rahil et Lina ...*

*A toute ma famille ...et tous ceux que j'aime.*

*Belguechi Nihed.*

## **Résumé :**

Dans cette étude des bactéries ont été isolées à partir des nodosités racinaires de la fève (*Vicia faba*) et caractérisées phénotypiquement et génotypiquement.

L'étude morphologique, culturale, microscopique, ainsi que la nutrition carbonée a révélé que nos isolats sont à croissance rapide et les caractères phénotypiques sont comparables avec ceux des rhizobia.

Les tests biochimiques évaluent la présence d'une activité enzymatique chez tous les isolats tels que la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase.

La tolérance aux facteurs abiotiques a souligné une limite de tolérance à un pH = 9, et une concentration de 1% pour le NaCl. Aucune tolérance n'a été observée à une forte température.

L'étude génotypique d'une partie conservée de l'ADNr 16S n'a pas montré une discrimination entre les isolats.

**Mots clés :** *Vicia faba*, nodosité racinaire, rhizobia, ADNr 16S, caractères phénotypique, étude génotypique.

## **Summary:**

In this study, bacteria were isolated from the root nodules of leguminous *Vicia faba* and characterized phenotypically and genotypically.

morphological study, cropping, microscopic, and the carbon nutrition showed that our isolates are rapidly growing and phenotypic characteristics are comparable to those of rhizobia.

Biochemical tests evaluate the presence of enzyme activity in all isolates such as nitrate reductase, urease and cellulase.

Tolerance to abiotic factors pointed to a tolerance limit at pH = 9, and a concentration of 1% for NaCl. No tolerance was observed at high temperature.

Genotypic study of preserved part of the 16S rDNA showed no discrimination between isolates.

**Keywords:** *Vicia faba*, root nodules, Rhizobia, 16S rDNA, phenotypic characteristics, genotypic study.

## ملخص

في هذه الدراسة تم عزل بكتيريا من العقد الجذرية للنبات الفول (*Vicia faba*) وتم وصفها مظهرها وورثتها. الدراسة المورفولوجية وقابلية النمو والمجهريّة إضافة إلى التغذية الكربونية أظهرت أن عزلاتنا سريعة النمو والصفات المظهرية مطابقة بالمقارنة مع *rhizobia*.

الاختبارات البيوكيميائية التي تقيّم وجود نشاط انزيمي عند جميع العزلات مثل *nitrate réductase*, *l'uréase*, *cellulase*.

مقاومة العوامل الغير حيوية سجلت حد مقاومة عند درجة حموضة =9 و تركيز 1% بالنسبة لكلوريد الصوديوم. لم يلاحظ أي مقاومة للدرجات الحرارة المرتفعة.

الدراسة الوراثية للجزء محفوظ من ADNr 16s لم تظهر تمييز بين العزلات.

الكلمات المفتاحية: *Vicia faba*, العقد الجذرية, *rhizobia*, ADNr 16S, الصفات المظهرية, الدراسة الوراثية.



## Table des matières

<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
1-Fixation biologique de l'azote	3
1-1-Les fixateurs libres	3
1-2-Les fixateurs symbiotiques	4
2-Symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse	4
2-1-Légumineuses	4
2-1-1-Classification	4
2-1-2-Importance agro-économique et nutritionnelle des légumineuses en Algérie	6
2-1-3-Généralité sur <i>Vicia faba</i> L.	6
2-2-Généralités sur les rhizobia	8
2-2-1-Diversité taxonomique des rhizobiums	8
2-2-2-Caractères généraux	10
3-Bases moléculaires de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse	11
3-1-Dialogue moléculaire	11
3-1-1-Les flavonoïdes	12
3-1-2-Les facteur Nod	12
4- Mécanisme de la nodulation	12
4-1- Mode d'infection	12
4-2-Développement du nodule	13
4-3-Leghémoglobine	15
5-Méthodes d'études de la caractérisation des rhizobia	15
5-1-Méthodes phénotypiques	15
5-2-Méthodes moléculaires	15
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
1-Isolement des bactéries à partir des nodules	17
1-1-Collecte des nodules	17
1-2-Conservation des nodules	18
1-3-Isolement des bactéries	20
1-3-1-Réhydratation des nodules	20
1-3-2-Stérilisation des nodules	20
1-3-3-Ecrasement et isolement des bactéries à partir des nodules	20
1-3-4-Purification des isolats	21
1-3-5-Examen microscopique par la coloration de Gram	21
1-4 Conservation des isolats	21



2-Test de nodulation	22
2-1-Stérilisation et germination des graines	22
2-2-Inoculation des graines	22
3-Caractérisation phénotypique des isolats	24
3-1-Tests physiologique	24
3-1-1-Tolérance au NaCl	24
3-1-2- Température de croissance	24
3-1-3-Effet du pH	24
3-2-Test nutritionnel : Utilisation de la Source de carbone	24
3-3-Tests biochimiques	24
3-3-1-Réduction de nitrate	24
3-3-2-Hydrolyse de l'urée	25
3-3-3-Activité cellulolytique	25
4-Caractérisation moléculaire par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADNr 16S	26
4-1-Extraction de l'ADN	26
4-2-Amplification d'une partie de l'ADNr 16S par PCR	26
4-3-Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	27
4-4-Digestion des produits PCR par l'enzyme de restriction <i>EcoRI</i>	27
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b>	
1- Caractérisation phénotypique des isolats	29
1-1- Etude morphologique et culturale	29
1-2- Caractères microscopiques	29
1-3- Test nutritionnel : Utilisation de la source de carbone	30
1-4- Tests physiologique	33
1-4-1- Tolérance au NaCl	33
1-4-2- Température de croissance	33
1-4-3- Effet du pH	36
1-5- Tests biochimiques	38
1-5-1- Réduction des nitrates	38
1-5-2- Hydrolyse de l'urée	38
1-5-3- Activité cellulolytique	39
2- Caractérisation symbiotique : Test de nodulation	41
3- Caractérisation génotypique des isolats par PCR/RFLP d'une partie de l'ADNr 16S	41
3-1- Amplification par PCR d'une partie de l'ADNr 16S	41
3-2- Profils de restriction enzymatique d'une partie de la région 16S de l'ADNr	43
<b>Conclusion</b>	44
<b>Références bibliographique</b>	45
<b>Annexes</b>	50



## Liste des figures

N° et titre de figure	N° de page
<b>Figure 1-</b> Dendrogramme représentant les trois sous familles des Légumineuses (Udvardi et col. 2005)	<b>5</b>
<b>Figure 2-</b> Anatomie de la fève ( <i>Vicia Faba</i> L.)	<b>7</b>
<b>Figure 3-</b> Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ Protéobactéries. Les genres en gras contiennent les rhizobium nodulant les légumineuses (Masson-Boivin et al., 2009)	<b>9</b>
<b>Figure 4-</b> Dialogue moléculaire rhizobia-légumineuse (Brencic et Winans, 2005)	<b>11</b>
<b>Figure 5-</b> formation d'un nodule (Tortora et coll., 2003)	<b>14</b>
<b>Figure 6-</b> Symbiosome comportant deux bactéroïdes (Day et al., 2001)	<b>14</b>
<b>Figure 7-</b> Localisation géographique indiquant la zone de prélèvement	<b>17</b>
<b>Figure 8-</b> Prélèvement des plantes et racines nodulées de <i>Vicia faba</i>	<b>19</b>
<b>Figure 9-</b> Conservation des nodules issus de la plante <i>Vicia faba</i>	<b>19</b>
<b>Figure 10-</b> Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)	<b>21</b>
<b>Figure 11-</b> Germination des graines de la fève sur l'eau gélosée	<b>23</b>
<b>Figure 12-</b> Test de nodulation dans des flacons en verre	<b>23</b>
<b>Figure 13-</b> Thermocycleur utilisé dans la réaction de PCR	<b>27</b>
<b>Figure 14-</b> Croissance des isolats sur différents milieux de cultures	<b>31</b>
<b>Figure 15-</b> Coloration de Gram	<b>32</b>
<b>Figure 16-</b> Croissance des isolats en présence de quelques sucres	<b>32</b>
<b>Figure 17-</b> Croissance des isolats à différentes concentration de NaCl	<b>35</b>
<b>Figure 18-</b> Croissance des isolats à différentes températures	<b>35</b>
<b>Figure 19-</b> Croissance des isolats à différentes concentration de pH	<b>37</b>
<b>Figure 20 –</b> Réduction des nitrates	<b>40</b>
<b>Figure 21-</b> Résultats de l'hydrolyse de l'urée	<b>40</b>

<b>Figure 22-</b> Résultats de l'activité cellulolytique chez nos isolats	<b>40</b>
<b>Figure 23-</b> Relation symbiotique entre la plante hôte et le partenaire bactérien	<b>42</b>
<b>Figure 24 -</b> Profils électrophorétiques des produits d'amplification d'une partie de l'ADNr 16S	<b>43</b>
<b>Figure 25-</b> Profils électrophorétiques de restriction enzymatique par l'enzyme EcoR1 par RFLP d'une partie la région 16S de l'ADNr	<b>43</b>

## Liste des tableaux

N° et titre de tableau	N° de page
<b>Tableau 1-</b> Composition chimique moyenne pour 100 g net de fève (Fachmann et Kraut, 2006)	<b>8</b>
<b>Tableau 2-</b> Croissance des isolats sur différents types de sucre	<b>30</b>
<b>Tableau 3 -</b> Croissance des isolats à différentes concentration de NaCl	<b>33</b>
<b>Tableau 4 -</b> Croissance des isolats à différentes températures	<b>34</b>
<b>Tableau 5-</b> Croissance des isolats a différentes concentration de pH	<b>36</b>
<b>Tableau 6 -</b> Réduction des nitrates par les isolats	<b>38</b>
<b>Tableau 7 -</b> Hydrolyse de l'urée par les isolats	<b>39</b>
<b>Tableau 8 -</b> Hydrolyse de la carboxy-méthyl-cellulose par les isolats	<b>39</b>

## Liste des abréviations

- ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique
- ADNr**: Acide Désoxyribo-Nucléique Ribosomal
- ARN** : Acide Ribonucléique
- BET** : Bromure d’Ethidium
- BCP** : Pourpre de Bromocrésol
- BTB** : Bleu de Bromothymol
- BNL** : Bactéries Nodulant légumineuse
- CMC** : carboxy méthyl cellulose
- dNTP** : désoxy Nucléotide Tri Phosphate
- EDTA** : Ethylène Diamine tétra Acétate
- GPA** : Glucose Peptone Agar
- pb** : paire de base
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- RC** : Rouge Congo
- RFLP** : Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction
- sp* : *species* (espèce non déterminée)
- TBE** : Tris Borate EDTA
- TY** : Tryptone Yeast Extract
- UV** : Ultra Violet
- V.faba*** : *Vicia faba*
- YMA** : Yeast Mannitol Agar
- YMB** : Yeast Mannitol Broth

A horizontal oval with a red-to-white gradient, centered on the page. The word "Introduction" is written in a bold, italicized black font in the center of the oval.

# ***Introduction***

### Introduction

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire du globe, les plus étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses (de Faria *et al.*, 1989).

La famille des légumineuses est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. Elle est cultivée dans le monde entier à des fins alimentaires, fourragères, médicinales ou encore écologiques et agricoles. Cependant, l'intérêt des Fabacées est directement lié à leur capacité d'établir avec les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) une symbiose fixatrice d'azote (Chen *et al.*, 1995).

La symbiose *Rhizobium* - légumineuse est de type mutualisme, où la plante apporte les nutriments carbonés et une niche écologique adéquate à la bactérie, en revanche la bactérie fixe l'azote atmosphérique à son partenaire végétal. Les légumineuses en association avec les rhizobia permettent l'introduction d'azote combiné dans le sol pour augmenter sa fertilité et réduire ainsi l'utilisation des engrais chimiques. Mais l'efficacité de cette symbiose est dépendante de l'hôte et du symbiote en relation (Bala et Griller, 2001).

Parmi le nombre important des légumineuses, nous avons choisie *Vicia Faba* pour étudier la biodiversité de la population bactérienne se trouvant dans sa rhizosphère. La légumineuse fève (*Vicia Faba*) est connue pour être peu exigeante en termes de qualité de sol et fixe l'azote mieux que toute autre légumineuse. Elle pourrait jouer le rôle d'engrais vert dans le processus de fertilisation et restauration des sols appauvris (Sullivan *et al.*, 1996).

Ainsi, dans le cadre du travail relatif à ce mémoire, nous avons entamé l'analyse des bactéries nodulant *Vicia Faba* selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules racinaires de la fève.
- Etude morphologique, culturale et microscopique des isolats.
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests :
  - Biochimiques (recherche de la nitrate réductase, l'uréase, la cellulase).
  - Physiologiques (effet du NaCl, pH, température).
  - Nutritionnels (source de carbone).



## *Introduction*

---

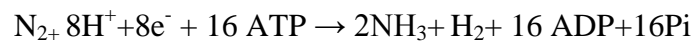
- Authentification des isolats par le test de nodulation.
- Caractérisation génotypique des isolats par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADN 16S.

A large, horizontally-oriented oval with a red-to-white gradient fill and a thin red border. The text is centered within the oval.

***Chapitre I***  
***Synthèse bibliographique***

## 1- La fixation biologique de l'azote

L'atmosphère contient une grande quantité de diazote (78% en volume) (Newton, 1998), mais cet azote gazeux est très peu bio-disponible pour la plupart des espèces. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries, dites diazotrophes, qui possèdent le complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase capable de casser la triple liaison  $N\equiv N$ . La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. (Downie, 2005). C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac ( $NH_3$ ). La réaction globale de fixation d'azote catalysée par la nitrogénase est la suivante :



La nitrogénase est un complexe enzymatique propre à certains procaryotes qui catalyse la séquence complète des réactions au cours des quelles la réduction de diazote  $N_2$  conduit à la formation d'ammoniac  $NH_3$ . Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, la plante maintient les nodules en conditions de micro-oxie grâce au parenchyme nodulaire pendant que la leghémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène. (Ott *et al.*, 2005).

### 1-1- Les fixateurs libres

Les fixateurs libres sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique, ils comprennent des genres de bactéries très divers : bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*), bactéries phototrophes (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des Cyanobactéries (*Synechococcus*). Ces bactéries fixatrices libres sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique. Ces associations vont de la simple multiplication bactérienne à la surface de la racine et la colonisation des espaces intercellulaires, c'est une caractérisation des bactéries endophytes. C'est le cas par exemple de la colonisation par *Azospirillum* des espaces intercellulaires de l'épiderme et du cortex racinaire du maïs et du sorgho (Kennedy *et al.*, 1997).

## 1-2- Les fixateurs symbiotiques

Certaines bactéries Gram négatif appelées rhizobia ou bactéries nodulant les légumineuses (BNL) sont capables de s'associer avec des plantes de la famille des légumineuses. Cette symbiose aboutit à la formation des nodules fixateurs d'azote sur les racines, parfois sur les tiges. D'autres non légumineuses présentent ce caractère, comme par exemple *Parasponia*, qui est membre de la famille des Ulmacées. Les Actinomycètes du genre *Frankia* (bactérie Gram positif, filamenteuses et sporulantes) nodulant les plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones, dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica*. Une symbiose particulière concerne la cyanobactérie *Anabaena* associée à la fougère aquatique *Azolla*, qui est utilisée comme engrais vert dans les rizières (Duhoux et Nicole, 2004)

L'association la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est la symbiose *Rhizobium*-légumineuses responsable d'une production d'ammoniac supérieure à la production industrielle.

## 2- Symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite. Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien est le symbionte. Chez les légumineuses, les rhizobia s'installent dans les racines des plantes. Ce dernier fournit des matières nutritives à la bactérie et celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte. L'optimisation de la symbiose entre les légumineuses et le microsymbionte exige la présence dans la rhizosphère des souches compatibles, compétitives et infectives qui sont hautement effectives pour la fixation de l'azote et présentes en nombre suffisant pour maximiser la nodulation.

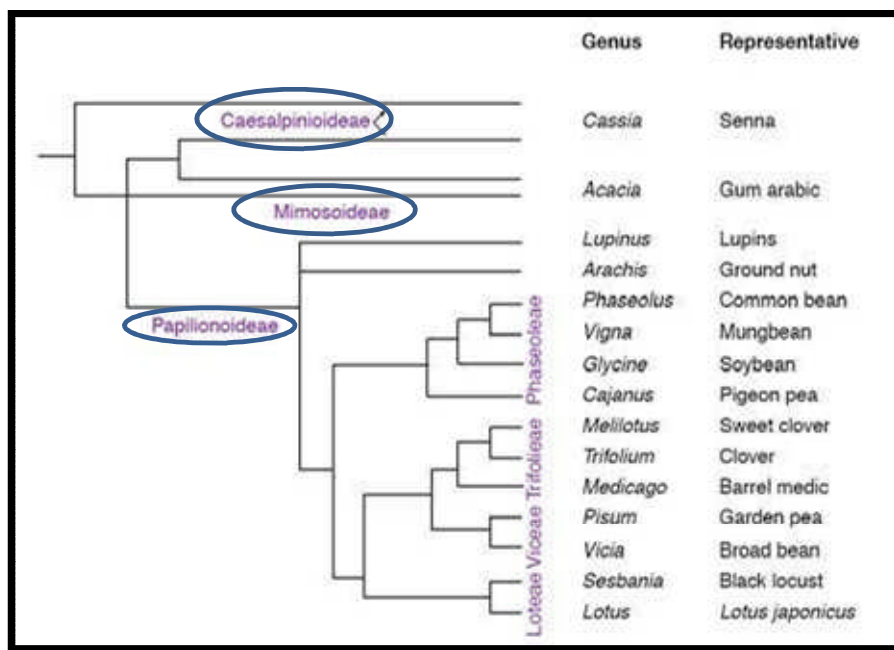
### 2-1- Légumineuses

#### 2-1-1- Classification

La famille des légumineuses ou Fabacées (*Fabaceae*) est classée parmi les Angiospermes, famille importante, rassemblant des arbres, surtout en régions tropicales, des arbustes et des plantes herbacées annuelles ou vivaces en zone tempérées, il s'agit de la troisième plus grande famille de plantes à fleurs en nombre d'espèces (après les orchidées et

les astéracées), avec environ 725 genres et près de 20000 espèces, Ces espèces sont réparties en trois sous-familles *Papilionoideae*, *Mimosoideae* et *Caesalpinioideae* (Figure 1).

- ***Caesalpinioideae*** : sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles de l'extérieur.
- ***Mimosoideae*** : sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces.
- ***Papilionoideae* ou *Fabaceae*** : Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de «papillon» La sous-famille des *papilionoideae* regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement : le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), et la fève (*Vicia faba*). Elle est cosmopolite et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus. Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Duhoux et Nicole, 2004).



**Figure 1** -Dendrogramme représentant les trois sous familles des Légumineuses (Udvardi et col. 2005).

### 2-1-2- Importance agro-économique et nutritionnelle des légumineuses en Algérie

En Algérie, les légumineuses (légumes secs), font partie du paysage agricole depuis des millénaires. Ces cultures sont utilisées dans la rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumineuses cultivées représentent une importante source protéique car elles produisent des protéines en abondance (leurs graines contiennent 3 fois plus de protéines que ceux des céréales), sans fertilisation azotée. Ainsi, elles constituent une importante source de nourriture humaine susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une large partie de la population algérienne (pois chiche, haricot, pois, lentilles, arachide, fève...). Ces légumes sont aussi calorifiques et riches en glucides que le blé (M .A : Ministère de l'Agriculture. 993-2002).

### 2-1-3- Généralité sur *Vicia faba* L.

#### a) Taxonomie de *Vicia faba*

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous-règne :	<i>Viridaeplantae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe :	<i>Rosidae</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Fabaceae</i>
Genre :	<i>Vicia</i>
Espèce :	<i>Vicia faba</i>

#### b) Description de la plante

Le genre *Vicia* comprend environ 120 espèces répartie principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord et de l'Amérique du sud avec quelque espèces en Afrique.

La fève est une plante annuelle herbacée de 30-80 cm, glabrescente, dressée et robuste à tige creuse quadrangulaire, à racine pivotantes parfois, superficielles plus généralement, portant des nodosités renfermant les bactéries spécifiques fixatrices d'azote atmosphérique. Les feuilles sont formées de 1 à 3 paires de folioles, sont grandes, ovales, entières et succulentes. Ses fleurs sont de couleur blanche avec une tache noir sur les ailes, regroupées de 2 à 5 en petites grappes. Le fruit appelé « gousse » a une longueur de 10 à 20 cm. Il est renflé, charnu, dressé et noir à la maturité. Les graines ont une longueur de 2-3 cm. Elles sont ovales, à hile linéaire (Bock, 2011).



**Figure 2** - Anatomie de la fève (*Vicia faba* L.)

### **C) Origine et répartition géographique**

L'espèce *Vicia faba* appartient à la famille des légumineuses est choisie comme type de la sous- famille des papilionacées, et à la tribu des viciées. Les fèves et fêveroles sont des cultivars d'une même espèce, *V. faba* L. D'après la grosseur de la graine, on peut distinguer les sous- espèces : *V. faba major* (la fève proprement dite, à grosse graines), *V. faba equina* (la fêverole à graines moyennes) et *V. faba minor* (La fêverole à petites graines). Les fêveroles à petites et moyennes graines sont originaires du sud- ouest de l'Asie (sud de la mer Caspienne), et la fève provient vraisemblablement d'Afrique. *V. faba* est essentiellement cultivée dans le bassin méditerranéen, en Amérique du sud et en Asie du sud- est, cultivée aussi en Europe occidentale et du nord (Brink et Belay, 2006).

### **d) Intérêt de la fève**

L'utilité de la fève dans l'alimentation humaine et animale comme source de protéines ainsi que leur effet bénéfique sur la fertilité des sols sont largement reconnus. Le tableau 1 présente la composition chimique moyenne pour 100 g de fève. L'utilisation de cette légumineuse est principalement orientée vers la consommation humaine en gousses fraîche à grande proportion et sous forme de graines secs ou au stade pâteux à faible proportion. Lors d'abondance le surplus des graines de fève est incorporé dans la composition d'aliments du bétail (Maatougui, 1997).

**Tableau 1-** Composition chimique moyenne pour 100 g net de fève (Fachmann et Kraut, 2006).

Compositions (g)	Vitamine (mg)
Glucides .....10,0	Acide ascorbique..... 82,00
Protides .....5, 40	Provitamine A (carotène).....0,100
Lipides .....0,30	B1 (thiamine).....0,300
Eau .....82,0	B2 (riboflavine).....0,200
Fibres alimentaire .....6, 50	B3 (nicotamide).....1,800
Minéraux (mg)	Apports énergétiques
Potassium .....210, 0	K calories.....64,00
Phosphore .....105,0	K joules.....268, 0
Calcium .....24, 0	
Magnésium ..... 18,00	
Soufre .....27,00	
Sodium .....4,00	
Chlore .....14,00	

## 2-2 -Généralités sur les rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol capables d'induire des nodules sur les racines ou les tiges de légumineuses et assurer la fixation de l'azote atmosphérique à l'intérieur de ces organes. En contre partie de la fixation d'azote, les rhizobia obtiennent un approvisionnement stable de carbone dérivés des composés de la photosynthèse (Duhoux et Nicole, 2004).

### 2-2-1 -Diversité taxonomique des rhizobia

En 1888, Beijerinck a pu isoler des microorganismes à partir des nodules de pois. *Bacillus radicola* était le premier nom utilisé pour les souches isolées. Le microbiologiste allemand Franc qui n'a pas été convaincu par l'identification de Beijerinck a proposé le nom *Rhizobium leguminosarum*. Plus tard, beaucoup de propositions taxonomiques ont été désignées pour nommer les bactéries isolées à partir des nodules. Ainsi, les rhizobia ont été traditionnellement assignés aux groupes taxonomiques sur la base des spécificités de l'hôte. Cette classification comportait un seul genre, le genre *Rhizobium* avec six espèces (Neyra, 1992).

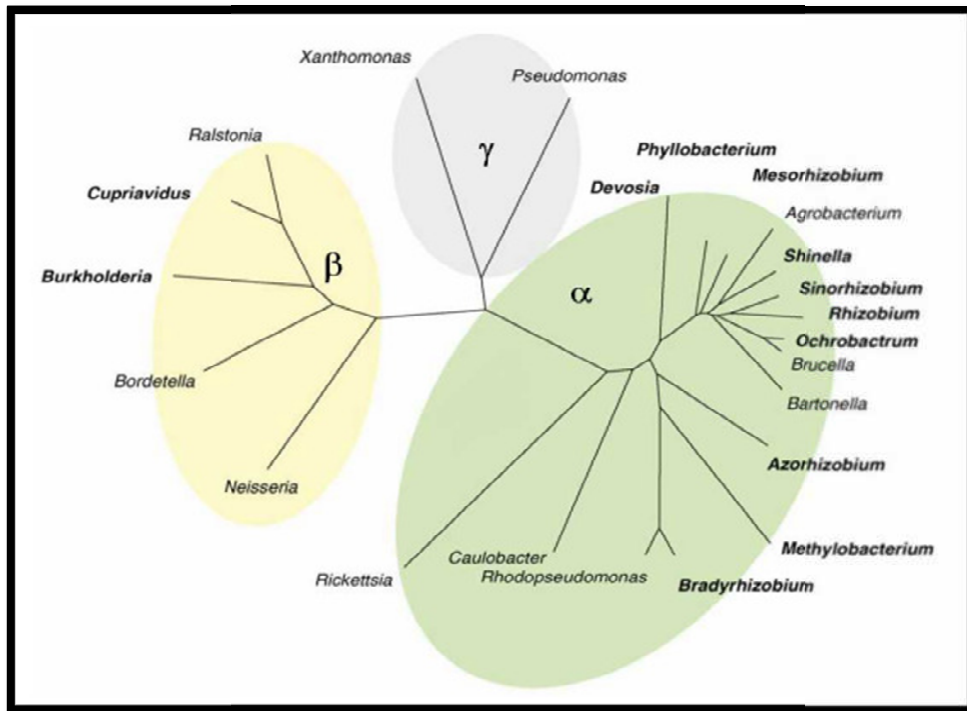
Actuellement, les rhizobia sont 13 genres et plus de 100 espèces symbiotiques appartenant aux sous classes alpha et beta-Protéobactéries (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>). Quatre genres d' $\alpha$ -Protéobactéries constituent les symbiotes majoritaires de la plupart des espèces de légumineuses rencontrées à travers le monde : *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*. Toutefois il existe d'autres genres d' $\alpha$ -Protéobactéries, induisant des nodules, moins fréquemment isolés, ayant une distribution



géographique réduite et un spectre d'hôte limité, et découvertes plus récemment : *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, et *Shinella*. Au cours des dernières années des rhizobia ont été aussi découverts dans les beta-Protéobactéries, dont les genres *Burkholderia sp* et *Cupriavidus* (Figure 3). La taxonomie des rhizobia a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études.

### Rhizobia associés à la fève

*Vicia faba* appartenant à la tribu des *Viciae* (*Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*...) ont longtemps été considérées comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce bactérienne, *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae*. Cette classification a changé depuis 2008, d'autres espèces de *Rhizobium* ont été décrites pour des souches capables de noduler cette espèce de légumineuses, comme *Rhizobium fabae*, isolé à partir de nodules *Vicia faba* en Chine et (Tian *et al.*, 2008). Récemment des nouvelles espèces nodulant *Vicia faba* dans différentes régions géographiques (Espagne, Pérou et Tunisie) a été proposée tel que : *Rhizobium laguerreae* (Saïdi *et al.*, 2014), *Rhizobium anhuiense* (Zhang *et al.*, 2015).



**Figure 3-** Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ - Protéobactéries. Les genres en gras contiennent les rhizobium nodulant les légumineuses (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

## 2-2-2- Caractères généraux

### a) Caractères morphologiques

Les rhizobia sont des bactéries du sol, bacilles Gram négatif strictement aérobies, hétérotrophes et non sporulant, possédant une forme bâtonnet mobile, on distingue deux formes (Somasegaran et Hoben, 1994) :

**-La forme végétative :** Les rhizobia sont des bâtonnets réguliers de 1,2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur sur 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$  de large, pourvus d'un flagelle polaire, ou de plusieurs flagelles péritriches. Les rhizobia pourvus de 2 à 6 flagelles sont caractérisés par une croissance rapide, tandis que les rhizobia à un seul flagelle polaire ou subpolaire ont une croissance lente.

**-La forme bactéroïde :** les rhizobia à l'intérieur des nodules se transforment en bactéroïdes de forme régulière ou irrégulière. Chez les groupes *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative.

### b) Caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries hétérotrophes, utilisent des carbohydrates simples tels que : le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances. *Rhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobies; alors que dans les conditions d'anaérobies, les espèces *Rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons.

### c) Caractères physiologiques

Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0. Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C. Les souches de *Rhizobium* peuvent se développer à pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben ,1994).

### d) Caractères culturaux

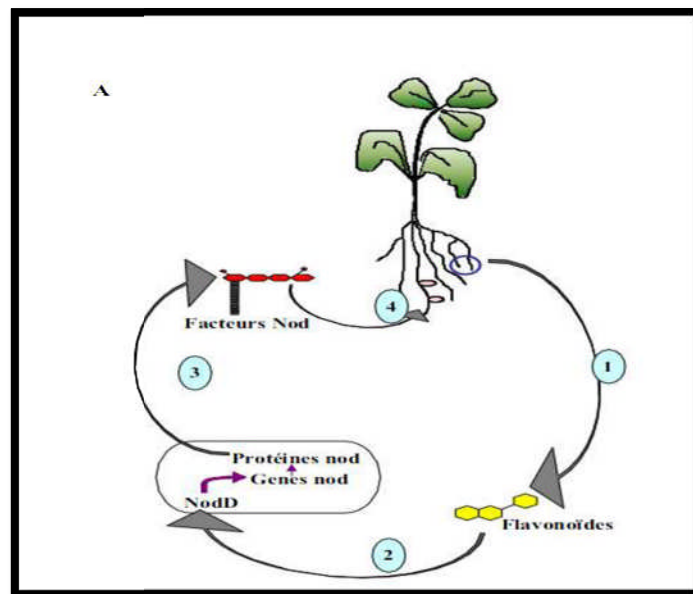
Les rhizobia à croissance rapide produisent une turbidité dans le milieu liquide (YMB) (Annexe 1) en 2-3 jours. Les *Bradyrhizobium* à croissance lente produisent une turbidité dans le milieu liquide pendant 3-5 jours. Le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) (Annexe 1) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de *Rhizobium*.sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles

peuvent être brillantes. Les colonies jaunes pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

### 3- Bases moléculaires de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse

#### 3-1- Dialogue moléculaire

L'installation de la symbiose est contrôlée par un dialogue moléculaire qui se met en place entre la bactérie et la plante hôte (Figure 4). Les flavonoïdes libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobia dans le sol, induisant l'expression des gènes *nod* (pour nodulation) chez *Rhizobium*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse des facteurs Nod, qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante. Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire. Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule (Dénarié *et al.*, 1996).



**Figure 4** - Dialogue moléculaire *Rhizobium*-légumineuse (Brencic et Winans, 2005).

- (1) Les racines de la plante hôte secrètent des flavonoïdes.
- (2) Les flavonoïdes sont perçus par les rhizobia et activent la protéine NodD à l'origine la transcription des gènes *nod*.
- (3) Les gènes *nod* permettent la synthèse et l'excrétion des facteurs Nod.
- (4) Les facteurs Nod sont perçus par les racines de la plante et induisent les premières réponses morphogénétiques à l'origine de la formation des nodules.

### 3-1-1- Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances chimiques de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ils interviennent dans la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia. Par chimiotactisme, ces bactéries colonisent la rhizosphère et s'attachent aux poils absorbants par l'intermédiaire des polysaccharides localisée à leur surface. Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes, qui stimulent la nodulation. Ces composés phénoliques sont des inducteurs des gènes *nod*, mais avec des efficacités variables selon leur concentration et leur structure chimique (Perret *et al.*, 2000).

### 3-1-2- Facteurs Nod

Les facteurs Nod sont des lipochitooligosaccharides (LCO) constitués d'un squelette de chitine, c'est-à-dire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4 (Figure 5). Une chaîne d'acide gras polyinsaturée est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Le nombre d'unités de N-acétyl-D-glucosamine constituant le facteur Nod est généralement compris entre 3 et 5. Les facteurs Nod peuvent encore être décorés à l'aide de substitutions chimiques particulières, qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité. La synthèse du squelette d'oligomères de chitine des facteurs Nod requiert l'activité de trois enzymes codées par les gènes *nodABC* (Duhoux et Nicole.,2004).

## 4- Mécanisme de la nodulation

### 4-1- Mode d'infection

Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection intracellulaire où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers des poils absorbants, et a été observé surtout chez des légumineuses tempérées (exemples : *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum*). En réponse aux facteurs Nod bactériens, l'infection se caractérise par une réorientation de la croissance des poils absorbants conduisant à la formation d'une courbure (Root Hair Curling : RHC) en forme de « crosse de berger ». Au cœur de cette crosse, un espace clos est formé, à l'intérieur duquel les rhizobia sont piégés et prolifèrent. Le confinement des bactéries forme ainsi un cordon d'infection intracellulaire suite à une invagination de la paroi végétale, où elles se multiplient (Figure 5).

#### **4-2- Développement du nodule**

En parallèle de la progression d'infection, l'organogenèse nodulaire se met en place. Les cellules racinaires végétales du cortex et du péricycle entrent en division et forme un primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, qui se différencie ensuite en nodule mature (Figure 5) Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale (Figure 6). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires. Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes, forme fixatrices d'azote adaptés aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule. Après avoir accueilli les bactéries, le primordium nodulaire va se développer pour former un organe symbiotique (le nodule). La différenciation cellulaire conduit à la formation d'un nodule avec des tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et tissu central nodulaire réparti en plusieurs zones distinctes. Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique.

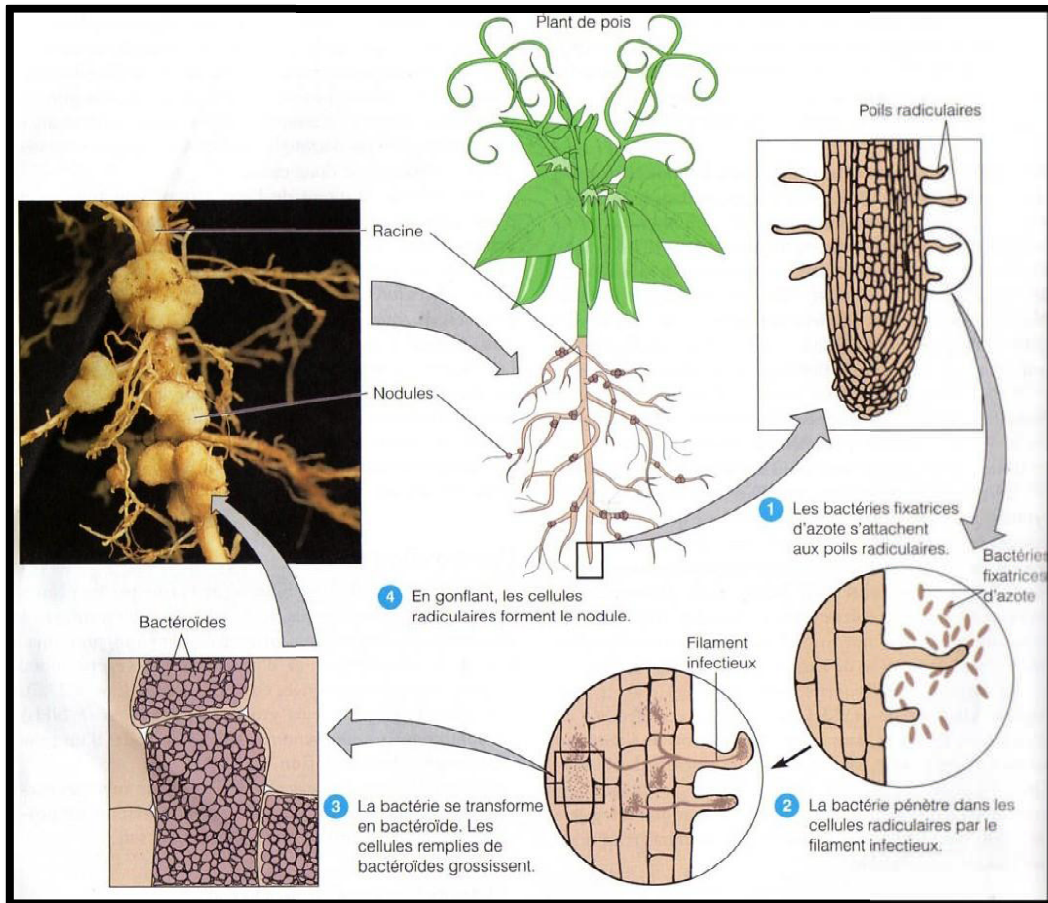


Figure 5 - formation d'un nodule (Tortora et coll., 2003).

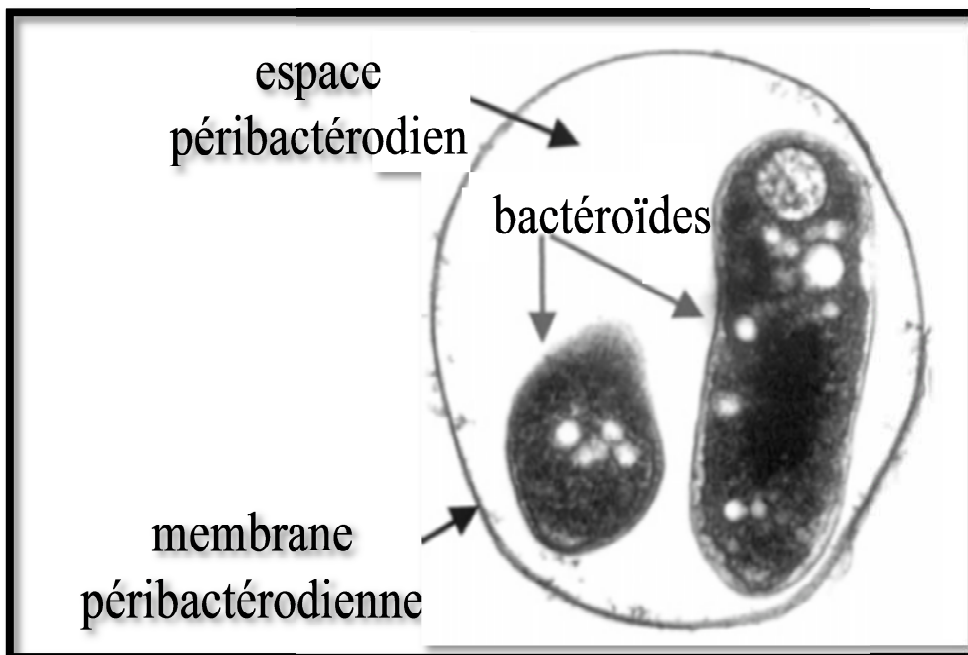


Figure 6 - Symbiosome comportant deux bactéroïdes (Day *et al.*, 2001)

### 4-3- Leghémoglobine

La leghémoglobine est une protéine sécrétée par la plante et qui joue un rôle dans le transport de l'oxygène en maintenant une faible pression d'oxygène dans le cytoplasme des cellules racinaires de la plante pour la phosphorylation oxydative. Elle permet ainsi de réguler la diffusion d'oxygène aux bactéroïdes. L'atmosphère dans l'environnement nodulaire étant alors favorable, la nitrogénase devient active et catalyse la réduction du  $N_2$  en  $NH_4^+$  (Ott *et al.*, 2005).

## 5 -Méthodes d'études de la caractérisation des rhizobia

Plusieurs techniques ont été utilisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des rhizobia. Ces techniques ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce.

### 5-1- Méthodes phénotypiques

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques tel que : (la forme, nombre et type de flagelles, la coloration de Gram, la forme de colonie), des critères symbiotiques indiquant la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée, des critères biochimiques évaluant la présence et/ou l'activité de différents enzymes comme la nitrate réductase, et l'uréase, des critères physiologiques (croissance à différentes températures, la tolérance aux variations du pH et aux différentes concentrations en sel), et leur capacité d'utiliser différents carbohydrates comme source de Carbone (Vincent, 1970 ; Graham *et al.*, 1991)

### 5-2- Méthodes moléculaires

Il existe de nombreuses techniques moléculaires chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents certaines utilisent les acides nucléiques ADN ou ARN pour étudier la localisation ou la variabilité en séquence des gènes ou de fragments de gènes. Les plus couramment utilisées dans l'étude de la diversité des rhizobia sont les suivantes:

- Détermination du % Guanine + Cytosine (%G+C) du génome
- L'hybridation ADN : ADN : technique permettant de mettre en évidence au sein d'une cellule ou d'un tissu, une séquence d'acide nucléique. Elle est basée sur le principe de complémentarité des bases nucléiques.

- Le séquençage de l'ADNr 16S : c'est principalement l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S qui est le marqueur moléculaire le plus utilisé dans l'analyse des relations phylogénétiques bactériennes au niveau du genre et espèces. Ce gène a comme avantage d'être présent chez toutes les bactéries, d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, et de fournir une séquence suffisamment informative. Dans les années 1990, l'ADNr 16S est devenu le marqueur taxonomique le plus important chez les rhizobia conduisant à la répartition des genres inclus dans la famille *Rhizobiaceae* et la création d'un nouvel ordre appelé "rhizobiales" proposé dans le Bergey's Manual (Kuykendall *et al.*, 2005). Ainsi l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce.
- Les méthodes de typages basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) : exemple PCR/RFLP.

**PCR-RFLP (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction) :** Dans la méthode PCR-RFLP, les fragments amplifiés par PCR sont digérés par des enzymes de restriction puis révélés par électrophorèse. Le nombre et la différence de migration des différents fragments obtenus permettent l'évaluation et l'analyse du polymorphisme apparent. Une des techniques qui dérive de cette méthode est la PCR-RFLP du gène de l'ADNr 16S connu également par l'ARDRA (Vanechoutte *et al.*, 1992). Cette technique est largement utilisée pour l'étude de la diversité génétique ainsi que la classification des rhizobia (Laguerre *et al.*, 1994).



A large, horizontally-oriented oval with a red-to-white gradient fill and a thin red border. The text is centered within this oval.

## ***Chapitre II***

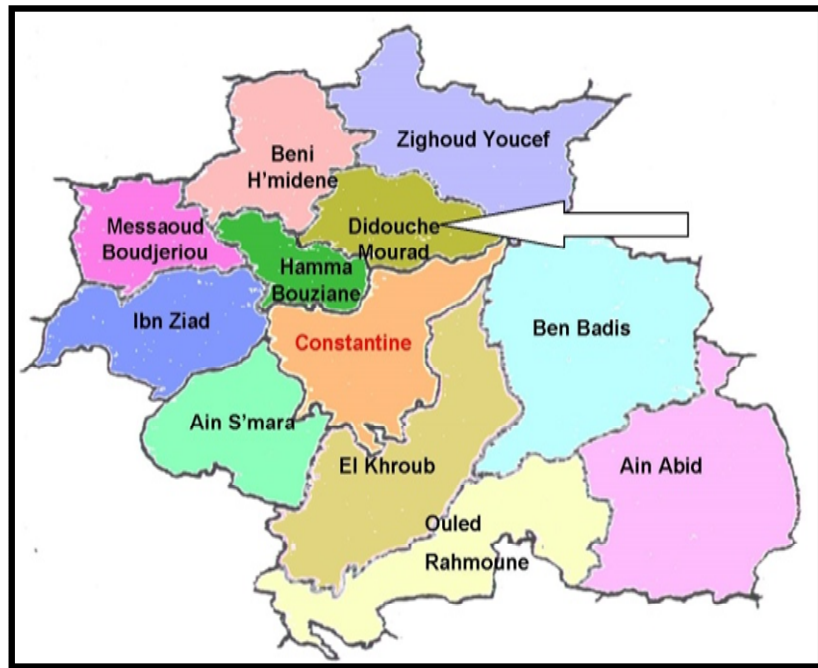
### ***Matériel et Méthodes***

## 1-Isolement des bactéries à partir des nodules

L'étude a été menée sur la fève (*Vicia faba* L.) qui est une excellente plante potagère facile à cultiver.

### 1-1-Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée au début Mars à partir des racines de la fève cultivée dans la région de Didouche Mourad Constantine (Figure 7).



**Figure 7** - Localisation géographique indiquant la zone de prélèvement

La collecte de la plante dont les racines contiennent le maximum de nodules de couleur rouge brun a été réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970) et Somasegaran, et Hoben (1994) (Figure 8). Cette technique consiste à :

- creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire aisément la plante avec son appareil racinaire.
- Enlever manuellement et soigneusement la terre entourant les racines sans abimer les nodules.
- Placer délicatement la plante avec la motte racinaire dans un sachet plastique.
- laver délicatement Les racines avec leurs nodules des restes de terre à l'eau courante.

- Pour des raisons de stockage et d'isolement, les nodules doivent être détachés à 1 ou 2 mm du site d'attache à l'aide d'une pince, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables de bactéries. Rincer les nodules, puis les sécher avec du papier filtre avant leur conservation.

### **1-2- Conservation des nodules**

Les nodules frais séchés au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h pour un usage immédiat.

Pour une longue conservation (6 mois à 12 mois), il est recommandé d'utiliser un dessiccateur tel que le chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Vincent, 1970). Le dessiccateur absorbe l'humidité et empêche la croissance des champignons et des autres bactéries.

La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), qui consiste à remplir la moitié des flacons en verre par du  $\text{CaCl}_2$ . Ensuite mettre une couche de coton sur laquelle les nodules séchés sont déposés (Figure 9).

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

- Le nom latin de la légumineuse (genre et espèce).
- Le lieu et la date de prélèvement.
- La date de conservation.

Les flacons sont mis immédiatement au réfrigérateur à 4°C.



Figure 8 - Prélèvement des plantes et racines nodulées de *Vicia faba*

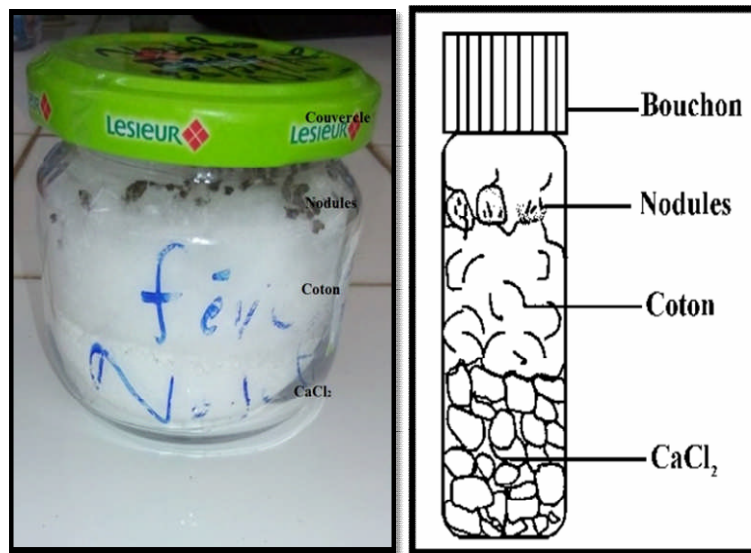


Figure 9 - Conservation des nodules issus de la plante *Vicia faba*

### **1-3-Isolement des bactéries**

L'isolement des bactéries a été réalisé à partir des nodules préalablement prélevés et conservés à 4°C.

#### **1-3-1- Réhydratation des nodules**

La technique d'isolement des bactéries est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés en les plaçant dans l'eau distillée pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C.

#### **1-3-2-Stérilisation des nodules**

Sous la hotte à flux laminaire, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95 % pendant 10 secondes, puis ont été désinfectés par une solution aqueuse saturée d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 5 min. Enfin, les nodules sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile et laisser à gonfler dans l'eau distillée stérile pendant 1heure après le dernier rinçage (Vincent, 1970).

#### **1-3-3-Ecrasement et isolement des bactéries à partir des nodules**

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent (1970) dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...).

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile bien séparées, dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile. Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen. A l'aide d'une anse de platine, une suspension de nodules (jus du nodule) est étalée sur les différents milieux sélectifs préconisés par Vincent (1970) (Annexe1) : Yeast-Mannitol-Agar (YMA), YMA additionné de rouge Congo (YMA +RC), YMA additionné de bleu de Bromothymol (YMA+BTB), Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA+ BCP) de manière à avoir des colonies isolées et faciles à caractériser. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 jours.

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées (Figure 10).

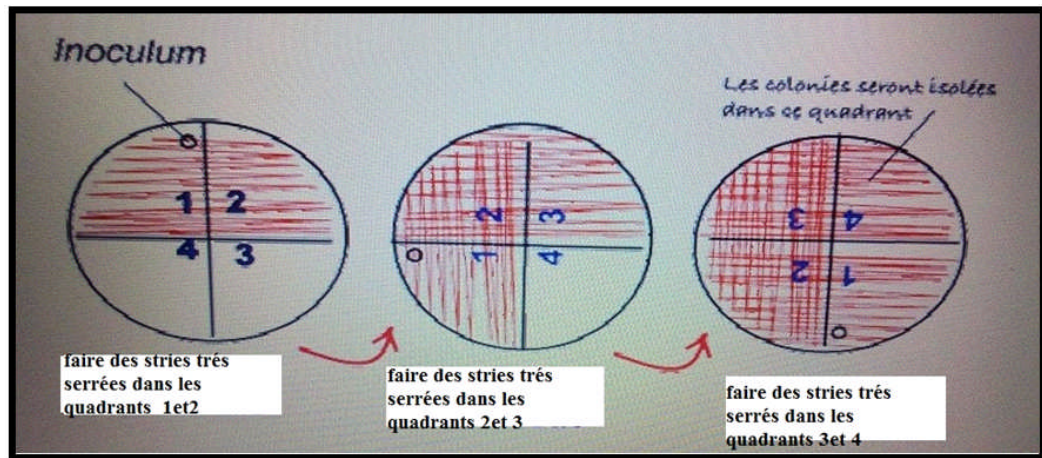


Figure 10 - Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

### 1-3-4-Purification des isolats

Après identification des isolats selon leurs caractères morphologiques et culturaux sur les différents milieux sélectifs, des repiquages réguliers ont été nécessaires pour leur purification. Dans des conditions d'asepsie, une colonie de chaque souche est ensemencée sur milieu YMA au rouge Congo. Cette méthode de repiquage peut être répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

### 1-3-5-Examen microscopique par la coloration de Gram

La coloration de Gram permet de vérifier la pureté de la culture et de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif (Annexe 3).

### 1-4 Conservation des isolats

La conservation des isolats a été réalisée sur le milieu YMA additionnée de 3 g/l de CaCO<sub>3</sub> comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

## 2-Test de nodulation

Ce test est un caractère important et pratique pour les rhizobia ou BNL. (bactéries nodulant les Légumineuses) et doit être analysé en détail (Graham *et al.*, 1991).

Le but de ce test est d'identifier nos isolats et d'évaluer leurs capacités et leurs aptitudes à former des nodules sur les racines de la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent 1970).

### 2-1- Stérilisation et germination des graines

Avant de procéder à la stérilisation des graines de fève, il faut les réhydratées on les plaçant dans l'eau distillée une nuit à 4°C, et les sélectionner c'est-à-dire elles doivent être non endommagés, et de taille identique. Sous la hotte à flux laminaire, les graines ont été désinfectées et stérilisées à l'éthanol 95% pendant 10 secondes, puis par une solution d'hypochlorite de calcium 3% pendant 5 min. elles sont ensuite rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile, puis laissées à gonfler dans le dernier rinçage pendant 1 heure. Les graines stériles ont été mises à germer dans un cristallisoir stérile contenant de l'eau gélosée semi solide (10g/l d'agar). Le cristallisoir a été couvert avec du papier aluminium pour assurer l'obscurité et laissé à température ambiante 2 à 3 jours jusqu'à la germination des graines (Figure 11).

### 2-2-Inoculation des graines

Les graines germées ont été transférées dans des flacons en verre de 200 ml remplis de solution nutritive Fahraeus (Annexe 2) additionnée de CaCO<sub>3</sub> à 1% et fermés par du papier aluminium perforés par deux trous, l'un par lequel on introduit la radicule de la graine germée et l'autre permettant l'introduction de l'inoculum bactérien. La suspension bactérienne a été apportée à raison de 1 ml (~10<sup>7</sup>cellules) par graine dès l'apparition des racines latérales.

Les plantes ont été cultivées en chambre de culture (température ambiante, photopériode 10 heures d'obscurité - 14 heures de lumière). Chaque traitement a été répété deux fois. Un traitement non inoculé à été inclus en tant que témoin. (Figure 12) Le développement des nodules a été suivi au cours des 4 premières semaines après inoculation.



**Figure 11-** Germination des graines de la fève



**(a)** Premier jour d'inoculation



**(b)** Après 7 jours d'inoculation

**Figure 12 -** Test de nodulation dans des flacons en verre



### **3-Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **3-1-Tests physiologique**

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter la population bactérienne dans le sol parmi eux le stress salin (NaCl), le pH, la température.

##### **3-1-1-Tolérance au NaCl**

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl : 1%, 2%, 3%, 5% ,10%. Incubation à 28°C pendant 48 à 72 heures.

##### **3-1-2- Température de croissance**

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA et incubés aux températures suivantes : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 44°C pendant 48 à 72 heures.

##### **3-1-3-Effet du pH**

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA aux différents pH: 4, 5.5, 6.8, 9,10. Incubation à 28°C pendant 48 à 72 heures.

#### **3-2-Test nutritionnel : Utilisation de la Source de carbone**

Les isolats ont été mis en culture sur le milieu YMA ou le mannitol est remplacé par 0.1% (w/v) des sucres suivants : Galactose, Fructose, Sorbitol, Saccharose, Lactose, Maltose, une boîte témoin est réalisée avec le mannitol. Incubation des boîtes à 28 °C pendant 48 à 72 heures.

#### **3-3-Tests biochimiques**

Le but de ces tests est la recherche de certains enzymes jouant un rôle important lors du processus d'infection des racines par les rhizobia, particulièrement : la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase.

##### **3-3-1-Réduction des nitrates**

La présence ou l'absence de nitrate-réductase se fait par la mise en évidence de la transformation des nitrates en nitrites. Les isolats sont cultivés sur le bouillon TY(Annexe1) additionné de KNO<sub>3</sub> à 0.1%(p/v) et incubés pendant 4 jours à 28° C. Après incubation on ajoute quelques gouttes des réactifs nitrate réductase I et II (Annexe 1), réactifs spécifiques à la recherche de nitrate-réductase. Une coloration rose ou rouge du milieu désigne une réaction

positive, mais certaines bactéries réduisent les nitrates directement en azote gazeux (N<sub>2</sub>) c'est-à-dire une coloration rose obtenue après addition de poudre de zinc. Le zinc est un agent qui a la capacité de réduire les nitrates en nitrites (Guiraud, 1998).

### 3-3-2-Hydrolyse de l'urée

L'urée est un composé organique considéré comme une source unique de l'azote aux bactéries possédant une uréase, grâce à cette enzyme les uréolytiques peuvent décomposer l'urée en ammonium qui conduit à une alcalinisation du milieu de culture. La mise en évidence de l'uréase est effectuée sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH (Jarvis *et al.*, 1977). Après la stérilisation de la solution d'urée par filtration (millipore 0.22 µm), on la rajoute au milieu préalablement stérilisé par autoclavage et maintenu à 45°C. Après 48h d'incubation à 28°C, les résultats sont évalués par un changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge ou rose fuchsia indique l'hydrolyse de l'urée et donc alcalinisation du milieu.

### 3-3-3-Activité cellulolytique

L'enzyme carboxy-méthyl-cellulase appelée aussi β-1,4-D-glucanase ou CMCase est une enzyme qui joue un rôle dans la nodulation et la phase initiale du processus d'infection (Bhat, 1997 ; Hu *et al.*, 2009). Une colonie bactérienne est mise en culture sur le milieu YMA contenant 0.25% (w/v) de carboxy-méthyl-cellulose (CMC). Après incubation pendant 5 jours à 28°C, les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante, puis inondées d'une solution de rouge Congo (1 mg/ml) et incubées à l'étuve à 28°C pendant 30 min. la solution du colorant rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1M, et laissée à température ambiante. Après 30 min les boîtes sont vidées et les colonies apparaissent sur le fond rouge de la boîte avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique.

## **4- Caractérisation moléculaire par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADNr 16S**

### **4-1-Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN total destiné à l'amplification par PCR, a été réalisée à partir des colonies bactériennes cultivées sur milieu gélosé YMA à 28°C pendant 48 heures. Les cellules jeunes ont été traitées à la protéinase K (Laguerre *et al.*, 1997). L'équivalent d'environ 10 µl de cellules (une oëse métallique pleine) est mis en suspension dans 200 µl de tris HCl à 5 mM (pH 8,2) auquel est ajouté 10 µl de protéinase K à 1.3 mg/ml d'eau milliQ. Ce mélange est incubé à 55°C pendant une nuit, puis la protéinase K est dénaturée à 100°C pendant 10 min. A partir du surnageant contenant l'ADN cible, nous avons effectué la réaction de PCR.

### **4-2-Amplification d'une partie de l'ADNr 16S par PCR**

La réaction en chaîne par polymérase (PCR : Polymerase chain reaction) permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN cible pour faciliter son étude.

La région d'une partie conservée de l'ADNr 16S a été amplifiée en utilisant les amorces A1 et A2 :

Amorce sens (A1) : 5'-TCA AAG TGA ATT GAC GGG GGC-3'

Amorce anti-sens (A2) : 5'-GCC CGG GAA CGT ATT CAC-3'

La réaction d'amplification (PCR) s'effectue dans un volume final de 25 µl contenant 250 µM de dNTP, 0,1 µM de chaque amorce, le tampon PCR à 1X 0,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5U/µl de Taq ADN polymérase (Promega) et 3 µl d'ADN.

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf- Mastercycler PCR Allemand) (Figure 13). Le programme d'amplification comporte une étape de dénaturation initiale de 10 min à 94°C, 35 cycles PCR (dénaturation 30 sec à 94°C, hybridation 30 sec à 50°C, extension 30 sec à 72°C) et un cycle final d'extension de 10 min à 72°C.



**Figure 13-** Thermocycleur utilisé dans la réaction de PCR

#### 4-3 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Afin de vérifier la qualité de la réaction d'amplification, 8 µl de produits PCR additionné de 2 µl de tampon de charge ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (Promega U.S.A) à 3 % dans lequel ont été ajouté 4 µl de BET (10mg/ml-Promega). Ce gel a été placé dans la cuve d'électrophorèse MUPID (Advance) à 100 V pendant 20 min dans une solution de tampon TBE (Tris-Borate EDTA 1X) préparé à partir de TBE 10X. Le Smart Ladder (Genetics) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. La visualisation a été faite sous UV à l'aide d'un imageur relié à une imprimante. La présence de l'ADN est révélée grâce à la fluorescence du BET piégé entre les molécules.

#### 4-4-Digestion des produits PCR par l'enzyme de restriction *EcoRI*

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction est une technique qui a pour but de couper les fragments d'ADN amplifiés par PCR. L'ADN est clivé grâce à une enzyme de restriction au niveau d'un site spécifique, appelé site de restriction de l'enzyme constitué de quelques paires de bases. La taille des fragments de restriction obtenus a été analysée par électrophorèse. L'enzyme choisie est *EcoRI*, qui reconnaît le site de restriction de la séquence suivante :



Un mélange réactionnel d'un volume final de 10  $\mu$ l a été préparé par 1  $\mu$ l de tampon réactionnel 10X spécifique de l'enzyme *EcoRI* (Promega), 10 U d'enzyme (1  $\mu$ l), 8 $\mu$ L de produits PCR. La digestion a été réalisée à 37°C pendant une nuit. Les fragments de restriction obtenus après ajout de 2  $\mu$ l de tampon de charge ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% (Promega USA) dans lequel ont été ajoutés 4 $\mu$ l de BET, placé à 100 V pendant 2 heures dans du tampon TBE (Tris-Borate 89 mM, EDTA 20 mM, pH 8,3). Le marqueur Smart Ladder (Genetics) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le gel a été visualisé sous UV à l'aide du même imageur utilisé précédemment pour la PCR. Les profils de bandes caractéristiques ainsi obtenus ont été comparés entre eux afin de pouvoir différencier les profils génotypiques des bactéries précédemment isolées.

## ***Chapitre III***

### ***Résultats et Discussions***

## 1- Caractérisation phénotypique des isolats

### 1-1- Etude morphologique et culturale

Afin d'identifier les isolats nodulant *Vicia faba*, nous nous sommes basé sur l'étude de quelques caractères morphologiques et culturales des colonies poussant sur des milieux sélectifs de *Rhizobium*.

#### a) Croissance sur le milieu YMA

Au bout de 48-72h d'incubation à 28 °C sur le milieu YMA, les cultures des cellules jeunes donnent des colonies circulaires, bombées avec un diamètre de 2 à 4 mm, de couleur blanche ou laiteuse, lisse, brillante avec une texture translucide (Figure 14a).

#### b) Croissance sur le milieu YMA + Rouge Congo

Les colonies sont de couleur blanche ou occasionnellement rose, donc les isolats absorbent peu ou pas le rouge Congo (Figure 14b). Ce qui explique la pureté de nos isolats car les contaminants absorbent fortement ce colorant et présentent un aspect rouge.

#### c) Croissance sur le milieu YMA + bleu de bromothymol (BTB)

Apparition des colonies avec virage du milieu de culture au jaune, indiquant une production d'acide estimée par le bleu de bromothymol, ce qui confirme que nos isolats sont à croissance rapide (Figure 14c). Contrairement aux souches à croissance lente qui alcalinisent le milieu de culture.

#### d) Croissance sur le milieu GPA contenant le pourpre de bromocrésol (BCP)

Les résultats n'ont montré aucune modification du milieu après 72 h d'incubation (Figure 14d), généralement ce milieu est utilisé pour le contrôle de la pureté des isolats.

### 1-2- Caractères microscopiques

La coloration de Gram a révélé que l'ensemble des isolats testés sont des bactéries Gram négatif en forme de bâtonnets (Figure 15). La coloration de Gram a permis également de vérifier la pureté de la culture.

Les résultats trouvés selon l'étude des caractéristiques morphologiques, culturales et microscopiques sont en concordance avec ceux observés par Vincent (1970), Jordan (1984), Rodriguez *et al.*, (1987), Beck *et al.*, (1993), Somasegaran et Hoben (1994). Chez les rhizobia. Et de ce fait, nous avons sélectionné 5 isolats nodulant *Vicia faba* cultivé dans la région de Didouche

Mourad Constantine qui peuvent appartenir au genre *Rhizobium*. Ces isolats ont été nommés : F2, F3, F5, F7 et F8. D'autres tests phénotypiques ont été nécessaires pour compléter ces résultats.

### 1-3- Test nutritionnel : utilisation de la source de Carbone

Le Tableau 2 montre que les différentes sources de carbone peuvent être utilisées par la plupart des isolats, mais on observe également une légère différence entre les différents isolats pour l'utilisation des sucres. La Figure 16 montre quelques exemples de croissance des isolats en présence de certains sucres. Tous les isolats montrent une bonne croissance en présence du D-mannitol et les hexoses comme le D-galactose et le D-fructose. Il existe une fréquence de dégradation variable des disaccharides (maltose et saccharose) par nos isolats. Une absence de croissance a été observée en présence du sorbitol et du lactose à l'exception d'une seule souche pour chaque sucre avec une très faible croissance.

Les résultats de cette étude montrent que nos isolats sont capables d'utiliser une grande variété de carbohydrates. Ceci appuie l'observation faite par Vincent (1970), Jordan (1984), Lindstrom et Lehtomaki (1988), Somasegaran et Hoben (1994) et (Amarger *et al.*, 1997) sur la capacité des rhizobiums à utiliser différents sucres. D'autres constatent qu'il existe des différences dans cette utilisation des carbohydrates (Rodriguez *et al.* , 1987 ; Struffi *et al.*, 1998).

**Tableau 2** –Croissance des isolats en présence de différents sucres

Sucres Souches	Maltose	Saccharose	Mannitol	Sorbitol	Lactose	Galactose	Fructose
F2	-	+	+++	-	-	++	+++
F3	+	++	+++	-	+	++	+++
F5	-	-	+++	-	-	++	+++
F7	+	+	+++	-	-	+++	+++
F8	+	++	+++	+	-	++	+++

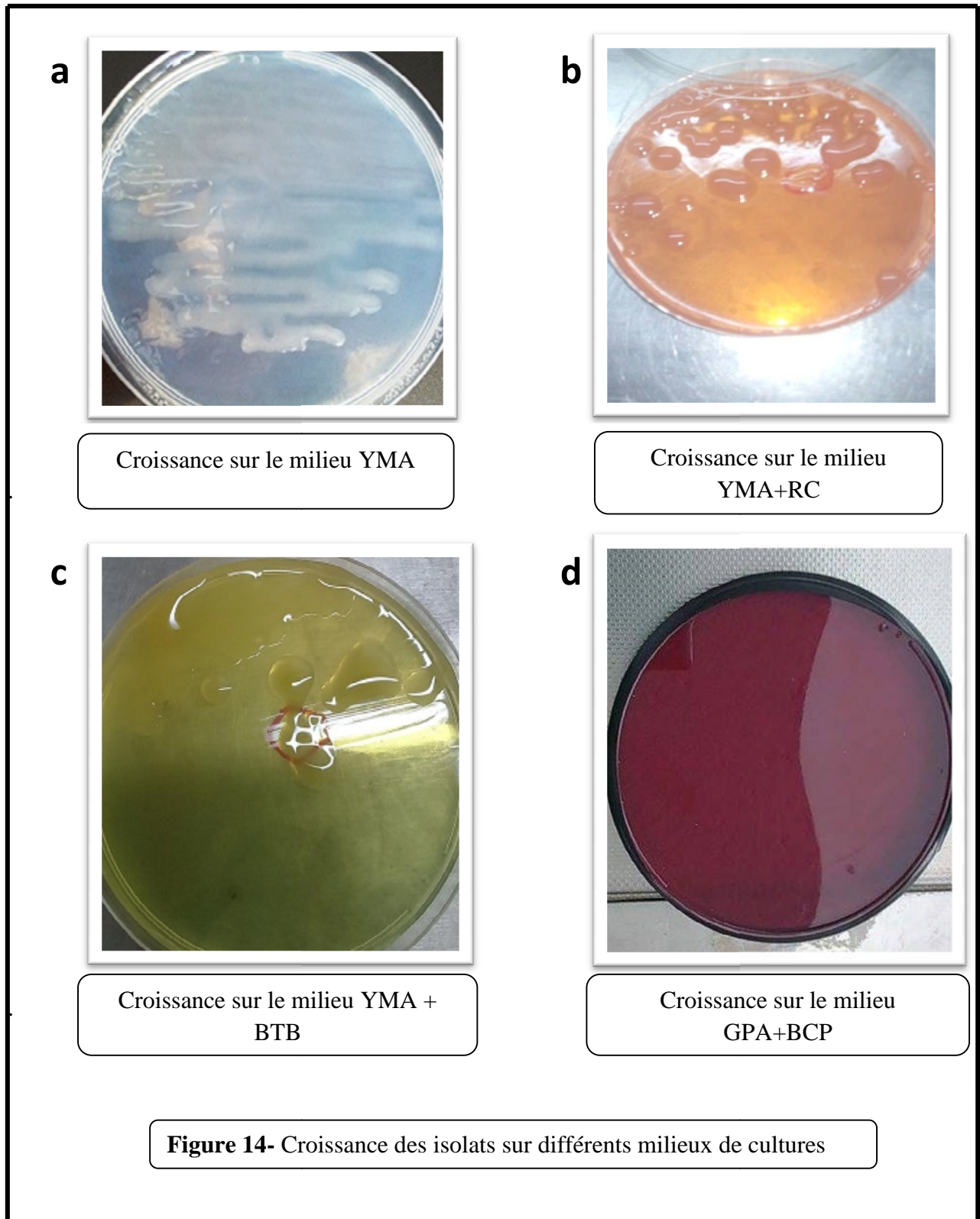
(+++): Très bonne croissance

(++): Bonne croissance

(+): Faible croissance

(-): Absence de croissance





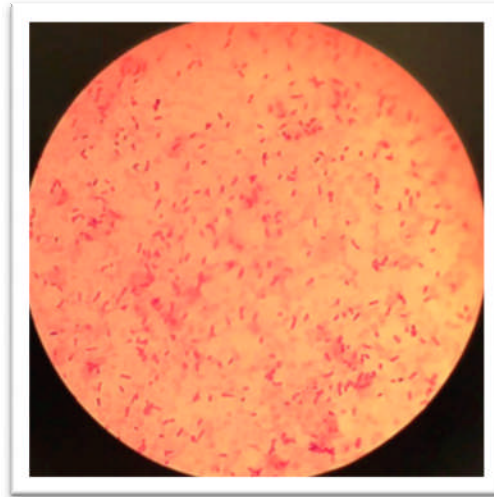


Figure 15- Coloration de Gram

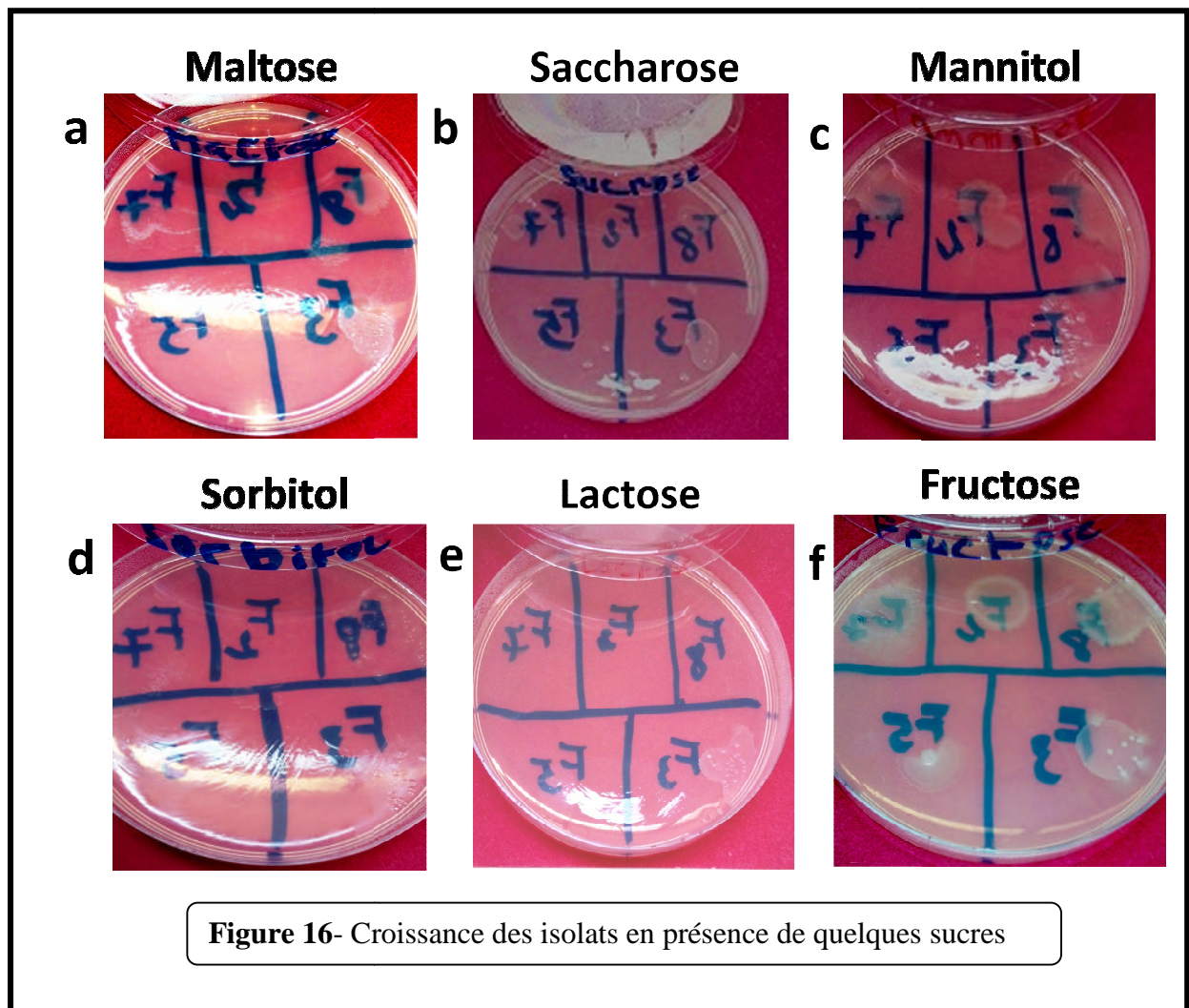


Figure 16- Croissance des isolats en présence de quelques sucres

## 1-4- Tests physiologiques

### 1-4-1- Tolérance au NaCl

Nous avons rassemblé dans le tableau 3 les différents résultats du test de NaCl. Tous les isolats ont toléré une concentration de 1% de NaCl, ceci est conforme aux résultats de Struffi *et al.*,(1998), qui ont montré que des souches de *Rhizobium* à croissance rapide ont pu pousser sur un milieu solide (YMA) à cette concentration. Hosny *et al.*,(1991) ont recherché la tolérance au sel des souches de *Rhizobium leguminosarum* nodulant *Vicia faba*, ils ont constaté que 55% de ces souches ont poussées à un taux de NaCl de 1% et seulement 2% ont survécu à une concentration de NaCl de 6%.

Aux concentrations en NaCl de 2% et 3%, deux isolats seulement poussent faiblement (Figure 17). Lindström et Lehtomäki ont rapporté également que 3 sur 13 souches de *Rhizobium leguminosarum* ont seulement toléré une concentration de 2% de NaCl. Dans notre étude, aucune souche n'arrive à supporter la concentration de NaCl à 5% et 10% (Figure 17).

**Tableau 3** -Croissance des isolats à différentes concentration de NaCl

NaCl / Souches	Témoin	1%	2%	3%	5%	10%
F2	+++	+++	+	+	-	-
F3	+++	+++	-	-	-	-
F5	+++	+++	-	-	-	-
F7	+++	+++	-	-	-	-
F8	+++	+++	+	+	-	-

(+++): Très bonne croissance

(++): Bonne croissance

(+): Faible croissance

(-): Absence de croissance

### 1-4-2- Température de croissance

Les résultats de test de température ont révélé que tous nos isolats ont pu croître aux températures 20°C et 28°C, avec une croissance optimale à 28 °C. Aucune croissance n'a été observée aux températures 4°C, 37°C, et 44 °C (Figure 18) (Tableau 4). Graham (1992) a rapporté que les rhizobia peuvent se développer à des températures se situant entre 28°C et 31°C, et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C. Mais, il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques (Lipsanen et Lindström, 1989) ou bien celles isolées dans l'environnement chaud

et sec de la savane du sahel en Afrique et qui peuvent tolérer des températures au-delà de 40°C (Karanja et Wood, 1988). Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes (Cloutier *et al.*, 1992).

**Tableau 4-** Croissance des isolats à différentes températures

Souches \ T°C	4°C	20°C	28°C	37°C	44°C
F2	-	++	+++	-	-
F3	-	++	+++	-	-
F5	-	++	+++	-	-
F7	-	+	+++	-	-
F8	-	++	+++	-	-

(+++): Très bonne croissance

(++): Bonne croissance

(+): Faible croissance

(-): Absence de croissance

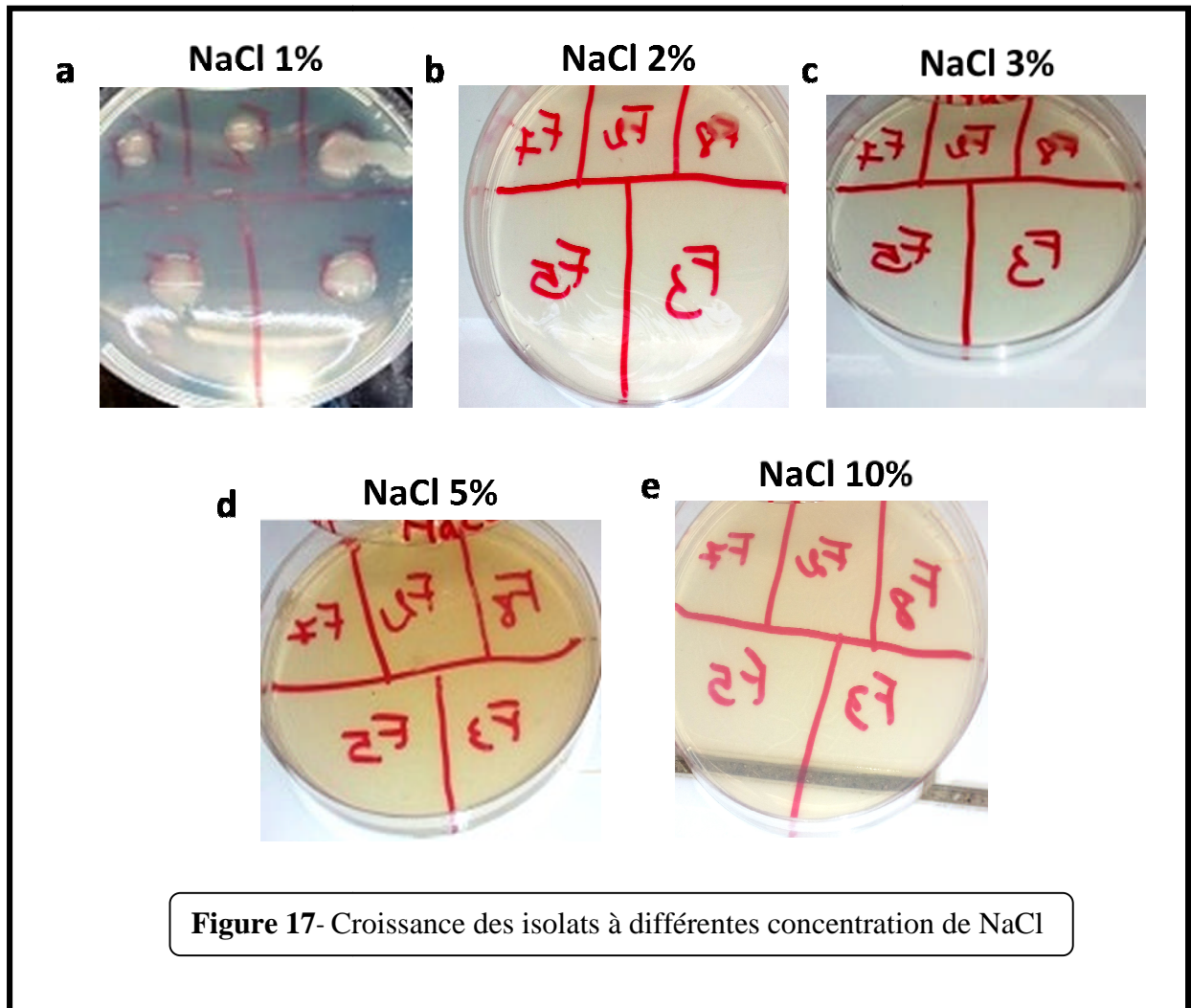


Figure 17- Croissance des isolats à différentes concentration de NaCl

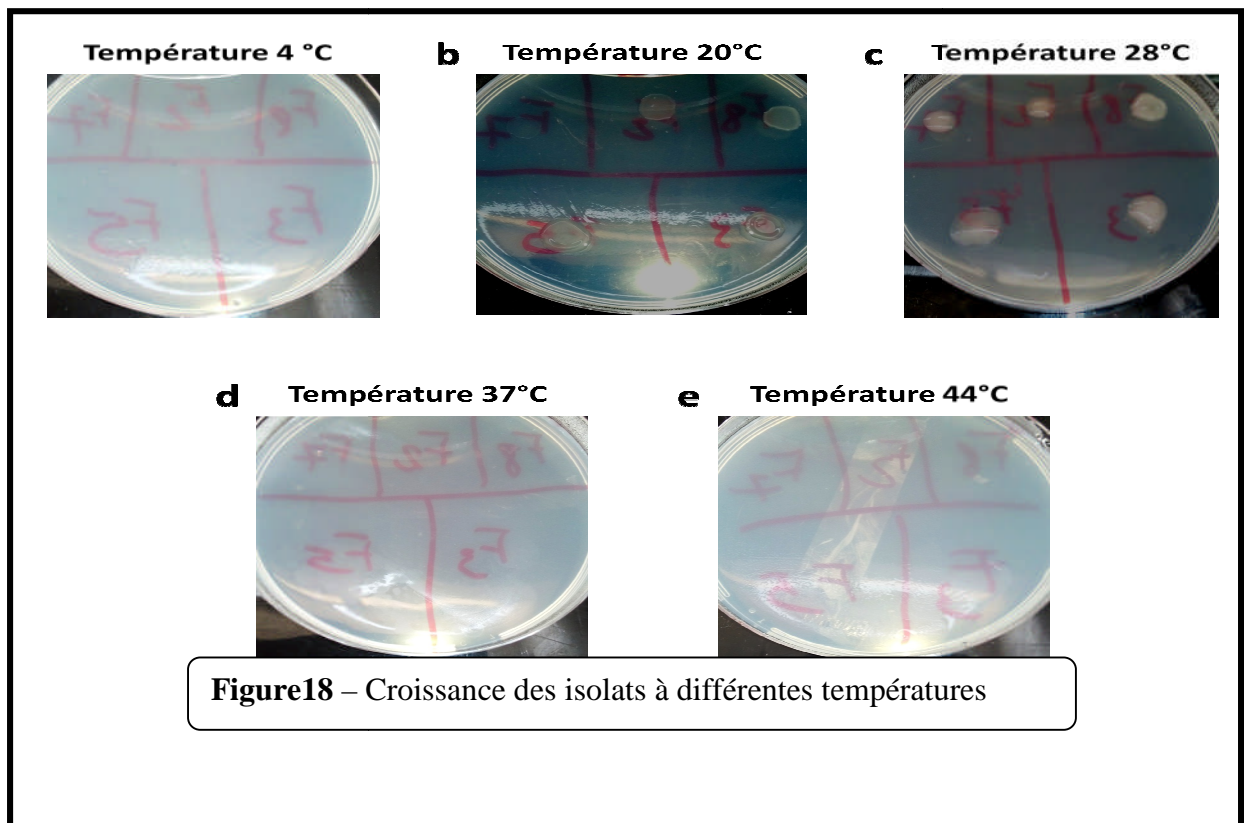


Figure18 – Croissance des isolats à différentes températures

### 3-3- Effet du pH

Les isolats ont été capables de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 5.5 à 9, la croissance est généralement absente à pH= 4 et 11 (Tableau 5). Un optimum de croissance pour tous les isolats testés est remarqué au pH=6.8 La Figure 19 montre quelques exemples de croissance à différents pH. Jordan (1984) a montré que la réponse des rhizobia face à une fluctuation du pH varie d'une souche à une autre. D'après Graham *et al.*, (1994) peu de rhizobia poussent à pH < 5 . En effet, Glenn et Dilworth (1994) ont rapporté qu'un groupe des souches bactériennes à croissance rapide à tendance à tolérer des milieux basiques allant jusqu'à pH 10.

**Tableau 5-** Croissance des isolats a différentes concentration de pH

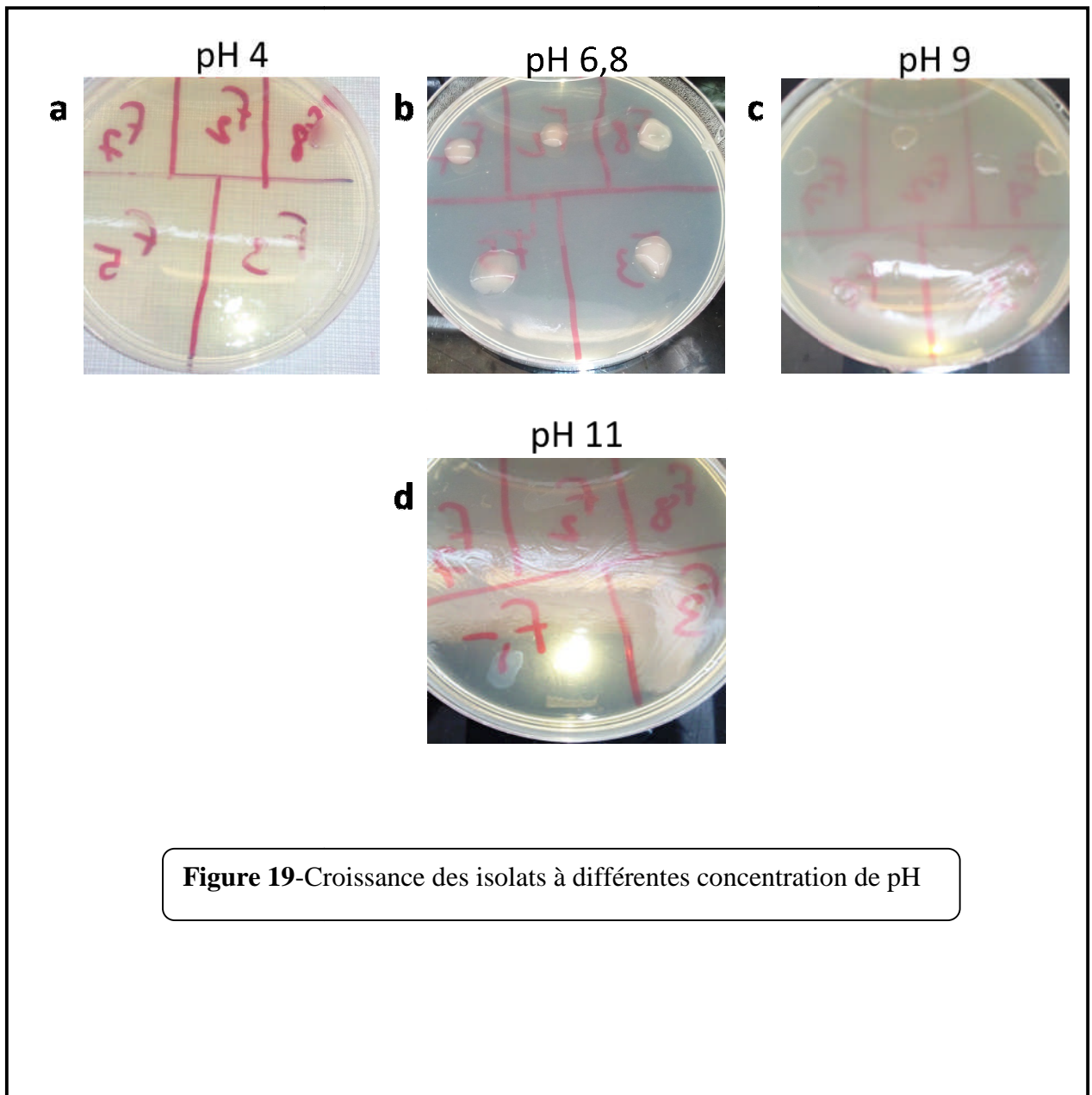
Souches \ pH	4	5 ,5	6,8	9	11
F2	-	++	+++	++	-
F3	-	++	+++	++	-
F5	-	++	+++	++	-
F7	-	++	+++	++	-
F8	+	++	+++	++	-

(+++): Très bonne croissance

(++): Bonne croissance.

(+): Faible croissance

(-): Absence de croissance.

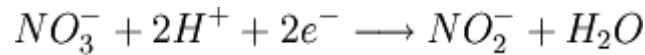


**Figure 19**-Croissance des isolats à différentes concentration de pH

## 1-5- Tests biochimiques

### 1-5-1- Réduction des nitrates

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par production des nitrites (réaction ci-dessous), qui donne une réaction colorée en rouge en présence d'acide sulfanilique « nitrate I » et l'alpha naphthylamine « nitrate II » en solution dans de l'acide acétique concentré.



Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactif nitrate I et II à la culture bactérienne, on observe un virage de la couleur du milieu vers le rouge (Figure 20) (Tableau 6), ceci signifie que tous nos isolats possèdent l'enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites les mêmes résultats ont été obtenus par Struffi *et al.*,(1998) et Manhart et Wong (1979). Cependant, d'autres auteurs ont constaté que certaines espèces de *Rhizobium* à croissance rapide ont réagit différemment dans la réduction des nitrates en nitrites, en montrant une réaction négative à cause de l'absence de l'enzyme nitrate réductase (Lehtomaki, 1988 ; Struffi *et al.*, 1998).

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et des plantes (El Hilali, 2006). La présence des nitrates dans le sol affecte la capacité de l'inféctivité des racines des légumineuses par les rhizobia.

**Tableau 6** –Réduction des nitrates par les isolats

Souches / Enzyme	F2	F3	F5	F7	F8
Nitrate réductase	+	+	+	+	+

(+) : Positif  
(-) : Négatif

### 1-5-2- Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia a hydrolyser l'urée est initialement décrite par Jarvis *et al.*, (1977). Parmi nos isolats, seules les souches F7 et F8 ont données un résultat positif en alcalisant le milieu de culture, en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH (Figure 21)(Tableau 7).L'augmentation du pH du milieu de culture suite a une réaction hydrolytique de l'urée par les isolats se traduit par un virage de la couleur de l'orangé rouge au rose violet .ceci indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Moblely, 1992).par contre le



reste des isolats n'ont donné aucune alcalinisation du milieu ce qui indique l'absence de l'activité uréolytiques chez ces isolats.

**Tableau 7-** Hydrolyse de l'urée par les isolats

Souches / Enzyme	F2	F3	F5	F7	F8
Uréase	-	-	-	+	+

(+) : Positif

(-) : Négatif

### 1-5-3- Activité cellulolytique

L'hydrolyse de carboxy-méthyl-cellulose se manifeste par un halo jaune autour des colonies après coloration au rouge Congo 1mg/ml (p/v). Une activité cellulolytique est observée chez tous nos isolats (Figure 22) (Tableau 8). Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Struffi *et al.*, (1998). Fahraeus (1957) suppose que *Rhizobium* stimule les plantes à produire des polygalacturonases qui dégradent la paroi cellulaire au niveau du site d'infection et favorisent la pénétration des rhizobia. Par contre d'autres auteurs ont montré que *Rhizobium* produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilite aux rhizobia de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992).

**Tableau 8-** Hydrolyse de la carboxy-méthyl-cellulose par les isolats

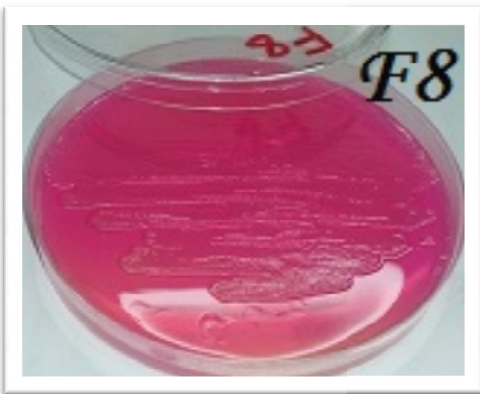
Souches / Enzyme	F2	F3	F5	F7	F8
Carboxy -méthyl -cellulose	+	+	+	+	+

(+) : Positif

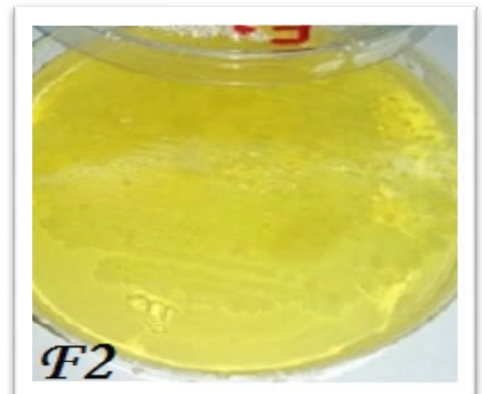
(-) : Négatif



Figure 20- Réduction des nitrates



Alcalinisation du milieu



Acidification du milieu

Figure 21- Résultats de l'hydrolyse de l'urée

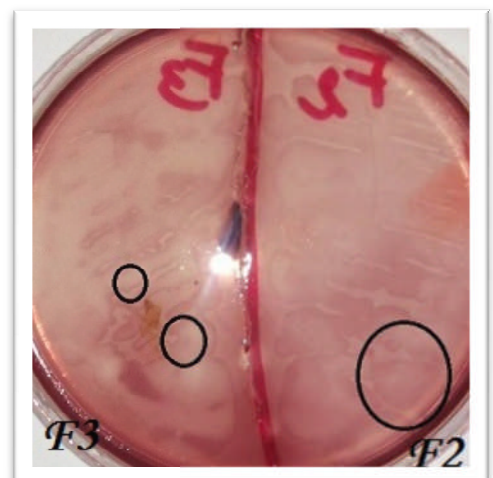
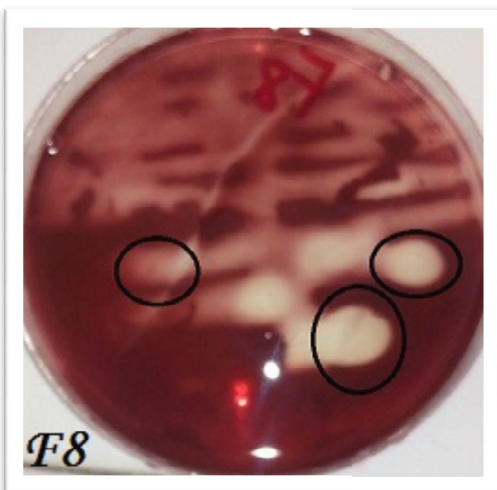


Figure 22- Résultats de l'activité cellulolytique chez nos isolats

## 2- Caractérisation symbiotique : Test de nodulation

Chaque isolat caractérisé morphologiquement a été testé *in vitro* pour sa capacité à former des nodules sur les racines de la légumineuse hôte (fève). Après 4 semaines de croissance des plantes (Figure 23), deux isolats seulement (F2 et F5) ont pu nodulés les racines de la plante hôte. ces isolats ont montré une faible infectivité avec des nodules de petite taille comprise entre 1 et 3 mm, de couleur blanche à rose claire (Figure 23). Pour les isolats (F3, F7 et F8), le test de nodulation s'est avéré négatif, ce résultat non espéré qui s'explique par une croissance limitée des plantes est probablement due aux conditions défavorables de photopériode, d'humidité, etc., ainsi ces isolats ont probablement perdu leur pouvoir de nodulation.

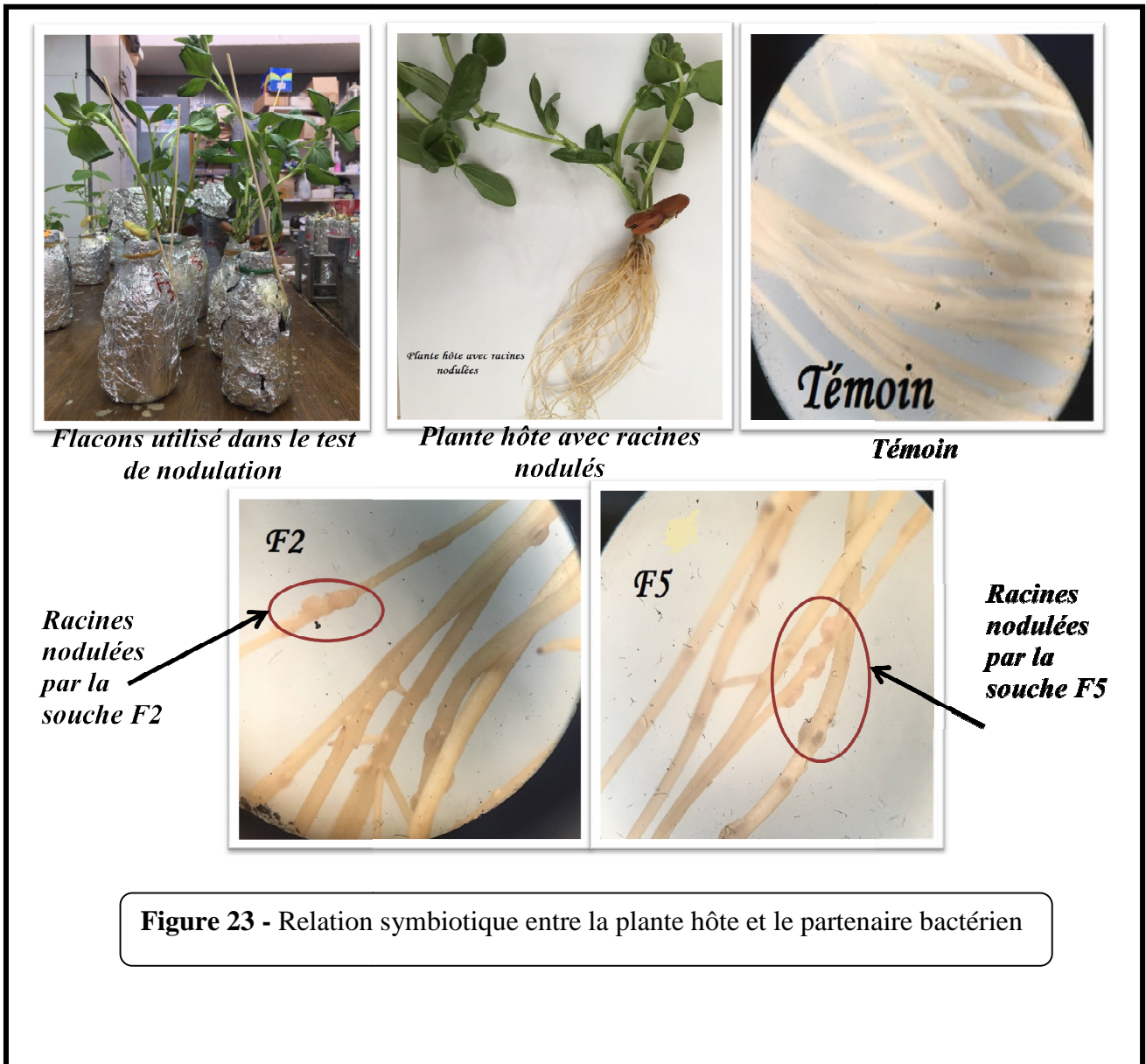
## 3- Caractérisation génotypique des isolats par PCR/RFLP d'une partie de l'ADN 16S

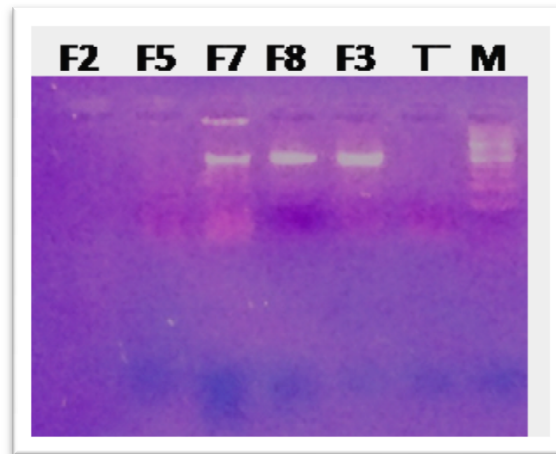
L'identification bactérienne se fait traditionnellement à partir des caractères phénotypiques de la bactérie : coloration de Gram, morphologie, aptitude à croître sur certains milieux de cultures, caractères biochimiques et physiologiques etc. détectés par diverses techniques. Toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement pour diverses raisons. La caractérisation génotypique simplifie dans ce cas l'identification. L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction du gène de l'ADNr 16S amplifié par PCR est l'une des méthodes les utilisées pour l'identification des rhizobia (Young *et al.*, 2001). Elle est rapide, ne nécessite pas de grandes quantités de matière première.

### 3- 1- Amplification par PCR d'une partie de l'ADNr 16S

L'amplification par PCR de la région d'une partie conservée de l'ADNr 16S a été réalisée pour nos 5 isolats, trois seulement ont pu s'amplifié et donner chacun une seule bande dont la taille est proche de 600 paires de bases (Figure 24).

Les termes de « 16S court » et « 16S long » sont utilisé dans le langage court des microbiologistes pour faire références à différentes longueurs de séquences amplifié. « 16S court » fait référence a l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ADNr 16S, le plus souvent les 500 premier nucléotides. Pour la pluparts des souches le pouvoir discriminant semble suffisant pour discriminer les espèces entre elles. Pour différencier certains genres ou pour décrire une nouvelle espèce, l'amplification du 16S long reste nécessaire (Clarridge III, 2004)

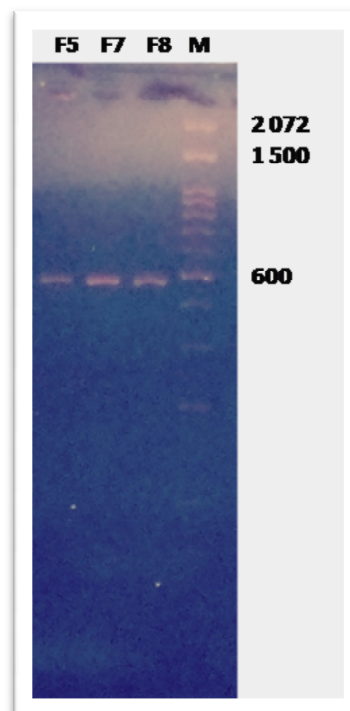




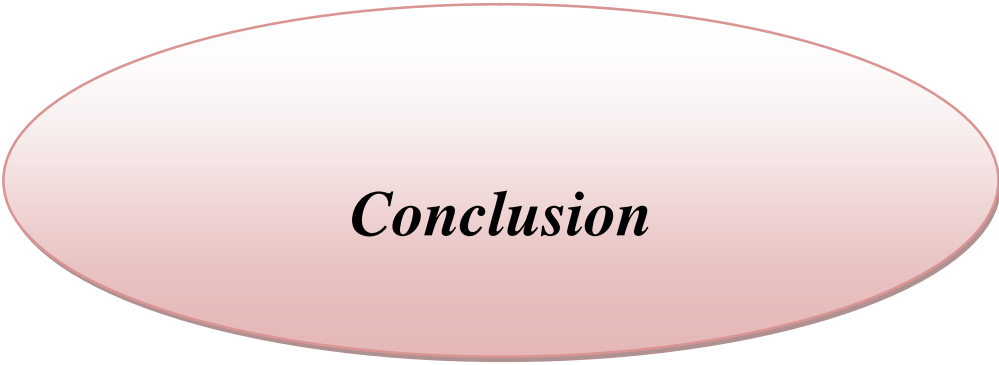
**Figure 24-** Profils électrophorétiques des produits d'amplification d'une partie de l'ADNr 16S

### 3-2- Profils de restriction enzymatique d'une partie de la région 16S de l'ADNr

L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction par l'enzyme *EcoRI* d'une partie du gène ADNr 16S amplifié par PCR, n'a généré qu'une seule bande dont la taille est toujours proche de 600 pb correspondant aux 3 isolats (Figure 25). Ceci s'explique que les 3 fragments d'ADN n'ont pas été coupés par *EcoRI*, et de ce fait on n'observe aucune discrimination entre les isolats. Cette enzyme n'a pas été efficace l'application d'autres enzymes de restriction serait nécessaire pour vérifier s'il existe un polymorphisme entre nos isolats.



**Figure 25-** Profils électrophorétiques de restriction enzymatique par l'enzyme *EcoRI* par RFLP d'une partie de la région 16S de l'ADNr.



***Conclusion***

## *Conclusion*

---

L'objectif principal de ce travail est l'isolement et la caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulant les racines de fève (*Vicia faba*) cultivée dans la région de Didouche Mourad Constantine.

Les résultats de l'étude morphologique, microscopique et culturale après la croissance des isolats sur des milieux sélectifs, ont montré qu'ils peuvent appartenir au groupe des rhizobia selon les caractéristiques soulignées par Vincent (1970) et Jordan (1984).

Dans le sol, la croissance des rhizobia exige la présence d'enzymes spécifiques tels que la nitrate-réductase, uréase et la cellulase. Ces enzymes sont présentes chez nos isolats.

Pour les facteurs environnementaux la salinité considérée comme un facteur limitant le développement des bactéries du sol. On marque une variabilité de tolérance au NaCl par nos isolats, jusqu'à une concentration de 2% en NaCl. Par contre aucune croissance n'a été observée aux concentrations 5% et 10% de NaCl, ce qui explique que nos isolats ne peuvent pas tolérer de forte concentration en NaCl. Quant à l'effet de la température nos isolats peuvent croître entre les températures 20°C et 28 °C. Une croissance optimale des isolats est obtenue à pH 6.8. D'autres souches résistent à pH acide de 5.5. Certaines tolèrent un pH alcalin égal à 9.

La majorité des carbohydrates testés se sont avérés de bonnes sources de carbone pour la plupart des isolats étudiés avec une assimilation préférentielle des disaccharides et des polyalcools.

L'inoculation de la plante cultivée dans des flacons en verre contenant une solution nutritive sans azote et la mesure de l'infectivité en conditions bactériologiquement contrôlées a révélé que trois isolats n'ont pas pu noduler les racines de la plante hôte en présence d'azote atmosphérique. Ce résultat négatif est probablement dû aux conditions défavorables (photopériode, humidité....)

L'analyse génotypique par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADNr 16S n'a révélé aucune discrimination entre les isolats.



***Références  
Bibliographiques***



- Amarger N, Macheret V, Laguerre G. 1997.** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. of Syst. Bact.* **47**: 996-1006.
- Bala A, Griller KE. 2001.** Symbiotic specificity of tropical three rhizobia for host legumes. *New Phytol.* **149**: 495-550.
- Beck DP, Materon LA, Afandi F. 1993.** practical *Rhizobium*-legume. Technical manual N°19.
- Bhat MK, Bhat S, 1997.** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. *Biotech. Advan.* **15** :583-620.
- Bock B .2011.** Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France Tela Botanica.
- Brencic A, Winans SC. 2005.** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **69**: 155-194.
- Brink M, Belay G. 2006.** Céréales et légumineuses secs, ressources végétales de l'Afrique tropicales. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. pp:102.
- Chen W, Wang E, Wang S, Li Y, Chen X, Li Y. 1995.** Characterisation of *Rhizobium trianshanense* sp. nov. A moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45(1)** :153-159.
- Clarridge JE III. 2004.** Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**. pp: 840-862
- Cloutier JD, Prévost P, Nadeau, Antoun H. 1992.** Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2846-2853.
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. 2001.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **58**: 61-71.
- de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989.** Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist.* **111**:607-619.
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC. 1996.** *Rhizobium* lipo-oligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry.* **65**: 503-535.
- Dowine JA. 2005.** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology.* **15**:6.

**Duhoux E, Nicole M .2004.** BIOLOGIE VEGETALE. Association et interactions chez les plantes.Eds. IRD. Montpellier. pp : 2-18.

**El Hilali I. 2006.** LA SYMBIOSE RHIZOBIUM-LUPIN : BIODIVERSITE DES MICROSYMBIOTES ET MISE EN EVIDENCE D'UNE MULTI-INFECTION NODULAIRE chez *LUPINUS LUTEUS* . Thèse de doctorat de l'université MOHAMED V- AGDAL. Rabat .pp :100.

**Fachmann, Kraut .2006.** L'intérêt de la fève. Eds. Bourde. Paris. pp : 74

**Fahraeus G.1957.** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. **16**:374-381.

**Glenn AR, Dilworth MJ.1994.** The life of root nodule bacteria in the acidic underground. FEMS Microbiol. Lett. **123**:1-10.

**Graham PH, Sadowsky MJ, Kersters HH, Barnet YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley DJ, Jarvis BDW, Roslycky EB, Strijdom BW, Young JPW. 1991.** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. International journal of systematic bacteriology. **41**: 582–587.

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

**Graham PH, Draeger k, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Naarons SR, Quinto C. 1994.** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**:198-207

**Guiraud JP.1998.** Microbiologie alimentaire. Eds. Dunod. Paris.

**Hosny IM, Zohdy L, Turkey. 1991.** Prevalence in Egyptian soils of *R. leguminosarum* bv. *Viciae* and their physiological properties. Egypt. Journal of Microbiology. **26**:209-222.

**Hu CY, Tseng WS, Hsieh CL, Chen HL, Yang SS. 2009.** Electron microscopy analysis of carboxyméthylcellulase in rhizobia.*Scil.Biol.Biochem.* **41**:431-434.

**Jarvis BDW, Mc lean TS, Robertson IGC, Fanning GR. 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.

**Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M. 1997.** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*,

and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International journal of systematic bacteriology. **47**: 895–898.

**Jordan DC. 1984.** Family III. Rhizobiaceae. In: Krieg NR, Holt JG (Eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore . pp : 234-242.

**Karanja N K, 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** :15-22.

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

**Kuykendall LD, Young JM, Martí'nez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2005.** Order Rhizobiales (new) family *Rhizobiaceae* genus *Rhizobium*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Eds. The alpha-, beta-, delta-, and Epsilonproteobacteria, the Proteobacteria, Part C, Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2, 2nd edn. Springer, New York. pp: 324–361

**Laguerre G, Allard MR, Revoy F, Amarger N. 1994.** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length poly- morphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 56–63.

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

**Lindstrom K, Lehtomaki S. 1988.** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium sp.* (galega) compared with other fast growing rhizobia. *FEMS-Microbiology Letters*.**50** :277-287.

**Lipsanen P, Lindstrom K.1989.** Lipopolysaccharide and protein patterns of *Rhizobium sp.* (Galega). *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:323-328.

**Maatougui MEH. 1997.** Situation de la culture des fèves en Algérie et principales.

**Manhart JR, Wong PP.1979.** Nitrate Reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can J Microbiol* **25**:1169-1174.

**Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes. *Trends Microbiol* .**17**: 458–466.

- Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, Squartini AS, Haack SK, Martínez-Molina E, Hubbeell DH, Dazzo FB. 1992.** Celle- associated pectinolytic and cellulolytic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Appl. Environ Microbial. **58 (6)** : 1816-1822.
- Mobely LTH. 1992.** Urease Microbial. Lederberg J. Eds. Encyclopedia of Microbiology. **4**:327-346.
- Newton WE. 1998 .**Nitrogénases : fonction et évolution. Bull.Soc. Fr. Microbiol.**13**: 238 -241.
- Neyra M. 1992.** Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuserhizobium. Front Cover · Food & Agriculture Org.
- Ott T, Van Dong JT, krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geignenberger P, Udvardi MK. 2005.** Symbiotic leghemoglobines are crucial for nitrogenfixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Curr Biol. **15** :531-535.
- Palinska KA, Jahnus T, Rippka NT. 2000.**Prochlorococcus marinus strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest uréase. *Microbiology*.**146**:3099-3107.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **64**: 180–201.
- Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2008.** Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R.leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. **58** : 2484 –2490.
- Rodriguez-Quinones F, Banfalvi Z, Murphy P, Kondorosi A. 1987.** Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. Plant Molecular Biology.**8**:61-75.
- Saidi S, Ramirez-Bahena MH, Santillana N, Zuniga D, Alvarez-Martinez E, Peix A, Mhamdi R, Vela'zquez E. 2014.** *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **64** : 242 –247.
- Struffi P, Corich V, Giacomini A, Benguedouar A, Squartini A, Casella S, Nuti MP. 1998.** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology. **84(1)** :81-89.
- Somasegaran P, Hoben HJ, 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer verlage . Eds .Inc. New York. pp :450.

**Sullivan JT, Eardly BD, Von Berkum P, Ronson CW. 1996.** Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:2818-2825.

**Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, Gu JG, Chen WX. 2008.** *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Food Microbiology*. **58**: 2871–2875.

**Tortora GJ, Funk BR, Case CL. 2003.** Introduction à la microbiologie. Eds du Renouveau Pédagogique Inc. pp : 945.

**Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. 2005.** Lotus japonicus: legume research in the fast lane. *Trends plant sci*. **10**:222–228.

**Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992.** Rapid identification of bacteria of the *comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 227-233.

**Vincent JM. 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, United Kingdom.

**Werner D. 1992.** Symbioses of plants and microbes .Philipps-University Marburg Germany. Eds. Chapman et Hall.

**Young JM, Kuykendal LD, Martinez- Romero E, Kerr A, Sawada H. 2001.** A revision of *Rhizobium* with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* and *Allorhizobium undicola*. *int.j.syst .Evol.Microbiol* .**51** :89-103

**Zhang YJ, Zheng WT, Everall I, Young JP, Zhang XX, Tian CF, Sui XH, Wang ET, Chen WX. 2015.** *Rhizobium anhuiense* sp.nov. isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int.J. Syst.Evol. Microiol.*, **65** :2960-2967.



*Annexes*

## Annexe 1

### Milieux de culture

- **Milieux de culture bactérienne :**

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

Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

YMA	1000ml
Agar	18

pH6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

YMA	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	18

pH 6.8

Autoclavage 120° pendant 20 minutes

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

**Composition de milieu YMA+bleu de bromotymol en g/l**

YMA	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5ml
Agar	15

pH 6.8

Autoclavage 120 ° pendant 20 minutes

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

**Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar) +pourpre de bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970)**

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	100ml
Agar	18

pH 6.8

Autoclavage 120° pendant 20 minutes

Après ajustement de pH du milieu GPA on ajoute 10 ml de pourpre de bromocrésol (1g de pourpre de bromocrésol dans 100 ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

**Composition de milieu YMA+ Carbonates de Calcium (g/l) (Vincent, 1970)**

YMB	1000ml
CaCO <sub>3</sub>	1
Agar	18

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes



**Composition de milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) (g/l) (Vincent, 1970)**

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0.87
Agar	18

pH 6.8

Autoclavage 120° pendant 20 minutes

**Les réactifs du nitrate réductase**

**Réactif I :** acide sulfanilique à 3% préparé dans l'acide acétique 5M.

**Réactifs II :**  $\alpha$  naphyltylamine à 0.5% préparé dans l'acide acétique 5M.

**Annexe 2****Solution de culture des plantes****Solution nutritive de Fahraeus ,1957 (g/l) (Vincent, 1970) :**

CaCl <sub>2</sub>	0.100
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.120
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.150
Citrate ferrique	0.005
Solution stock des oligoéléments	1.0 ml
pH 6.8	

**Solution stock des oligoéléments en g/l**

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2.03
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.14

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### Annexe 3

#### 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 min.
- 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 min.
- Laver à l'eau distillée.
- Observation microscopique avec une goutte d'huile à immersion (Objectif  $\times 100$ ).

**Annexe 4****Solution et gel utilisés dans la  
PCR/RFLP****• Composition de la solution tampon Tris – Borate – EDTA**

TRIS (89 mM)	10,78 g
Acide borique (89 mM)	5,50 g
EDTA (2 mM)	0,58 g
Eau distillée	1000ml
pH	8,2

**• Gel d'agarose**

Tampon TBE	100ml
Agarose	0,8 g

**Thème :**

**Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la fève (*Vicia faba*) cultivée dans la région de Didouche Mourad à Constantine**

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

**Résumé :**

Dans cette étude des bactéries ont été isolées à partir des nodosités racinaires de la fève (*Vicia faba*) et caractérisées phénotypiquement et génotypiquement.

L'étude morphologique, culturale, microscopique, ainsi que la nutrition carbonée a révélé que nos isolats sont à croissance rapide et les caractères phénotypiques sont comparables avec ceux des rhizobia.

Les tests biochimiques évaluent la présence d'une activité enzymatique chez tous les isolats tels que la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase.

La tolérance aux facteurs abiotiques a souligné une limite de tolérance à un pH = 9, et une concentration de 1% pour le NaCl. Aucune tolérance n'a été observée à une forte température.

L'étude génotypique d'une partie conservée de l'ADNr 16S n'a pas montré une discrimination entre les isolats.

**Mots clés :** *Vicia faba*, nodosité racinaire, rhizobia, ADNr 16S, caractères phénotypique, étude génotypique.

**Laboratoire de recherche :** Ecologie Microbienne – Département de Microbiologie – Faculté des sciences de la Nature et de la Vie – Université des Frères Mentouri Constantine 1.

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** M<sup>me</sup>. R. ALATOU

**M.C - UFM Constantine**

**Rapporteur :** M<sup>me</sup>. N. RIAH

**M.C - UFM Constantine**

**Examineur :** Mr. Y. BENHIZIA

**Professeur –UFM Constantine**

**Date de soutenance :** 12/06/2016