



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 lentille
(*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à
Constantine**

Présenté et soutenu par:

Khallel Lina Rayene
Bendana Rahil Imene

Le: 12/06/2016

Jury d'évaluation:

Président du jury: Mme. I. Guergouri

M.C- UFM Constantine

Rapporteur: Mme. N. Riah

M.C- UFM Constantine

Examineurs: Mme. A. Hecini

M.C- UNI3 Constantine

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciement

Tout d'abord, nous rendons grâce à Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur de mémoire madame **RIAH NASSIRA**. On la remercie de nous avoir encadrée, orientée, aidée et conseillée.

On adresse nos sincères remerciements à Mr **BENHAYZIYA YASSINE** de nous avoir permis d'effectuer ce projet dans son laboratoire.

A toutes personnes intervenant par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques qui ont guidé nos réflexions et ont accepté à tout rencontrer et répondre à nos questions durant notre recherche (Mlle **BOUKAWS LEILA**, **TIR RAJA**, **MELLAL HANANE**, **MADAME BOUZIDI NADJAT** et **SLOUGI SADEK**).

Nos remerciements à tata **ABLA HECINI** pour sa précieuse aide au bon moment.

A tonton **AZIZ BOUNAB** aussi.

On remercie nos très chères parents qui ont toujours été là pour nous, ils nous ont donné un magnifique model de labeur et persévérance, nous sommes redevables d'une éducation dont nous sommes fières.

DEDICACE

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie le fruit de ce modeste travail:

A mes chers parents **ABDELHAMID** et **FOUZIA**, mes premiers encadrant depuis ma naissance qu'ils trouvent ici l'hommage de ma gratitude qui si grande qu'elle puisse ne sera à la hauteur de leurs sacrifices et leurs prières pour moi

A mes sœurs **MAROUA** et **MERIEM** à qui m'ont très chères et à qui je souhaite réussite et bonheur dans leurs vie

A mes grands parents **BABA SAID**, **MA MALIKA** et **MA TIMA**

A la mémoire de mon grand père **ALI** et **KHALTI** qui nous ont quitté et que nul ne peut combler le vide qu'ils nous ont laissé

A mes cousines, cousins, oncles et tantes maternels et paternels

A mon binôme M^{elle} **KHELLEF LINA RAYENE**

A **AMOURACHE INES** et **BELGHACHI NIHAD**

A mes amies et aux personnes qui m'ont très chères, à ceux que j'ai aimés et estimés du fond du cœur

RAHIL IMENE

DEDICACE

Je dédie ce mémoire:

A mes chers parents, ma mère **RAZIKA** et mon père **AZZEDINE**, pour leurs patiences, leurs amours, leurs soutiens et encouragements et leurs prières pour moi.

A mes sœurs **NORHENE** et **SOFIA**

A mon frère **SAMI AMINE**

A mes cousines spécialement **NANY**, cousins, oncles et tantes maternels et paternels.

A mon binôme **BENDANA RAHIL IMENE**

A tous mes amis les plus chers

A **BELGHECHI NIHED** et **AMOURACHE INESS**

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail; qu'ils trouvent ici la traduction de notre gratitude et de notre reconnaissance

LINA RAYÈNE

Résumé

Dans cette étude cinq bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara Constantine. L'étude morphologique et culturale classe ces isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium*. Les tests biochimiques évaluent la présence d'une activité de différentes enzymes chez tous les isolats telles que : la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase. Les résultats ont montré que ces isolats assimilent préférentiellement les disaccharides et les sucres alcool. La caractérisation phénotypique par les tests de tolérance aux stress abiotiques (salinité, pH et température) a mis en évidence une limite de tolérance des isolats respectivement de 11 pour le pH, 5% pour le NaCl et une température optimale à 28°C. La caractérisation symbiotique a révélé la formation de nodule chez 3 isolats sur 5. Enfin d'après la caractérisation génotypique PCR/RFLP aucune discrimination n'a été révélée entre les 5 isolats.

Mots clés

Rhizobium, *Lens culinaris*, nodules racinaires, caractérisation phénotypique et génotypique

Summary

In this study, five bacteria were isolated from root nodules of lentil (*Lens culinaris*) grown in ain smara Constantine. Morphological and cultural Study class this isolates as fast-growing bacteria, a characteristic on the genus Rhizobium. Biochemical tests assess the presence of activity of different enzymes in most isolates such as: nitrate reductase, urease and cellulose. The results showed that these isolates preferentially assimilate disaccharides and “sugar alcohol”. Phenotypic characterization by testing tolerance to abiotic stresses (salinity,pH and temperature) showed a maximum level of the isolates, respectively, for NaCl 5%, pH 11 and 28°C for temperature. The symbiotic characterization revealed formation of nodules in 3 from 5 isolates. Finally after genotypic characterization PCR / RFLP no discrimination was found between 5 isolates.

Keywords:

Rhizobium, *Lens culinaris*, root nodules, phenotypic and genotypic characterization

تلخيص

في هذه الدراسة تم عزل خمسة بكتيريا من العقد الجذرية من العدس (عدسة *culinaris*) نمت في منطقة عين السمارة قسنطينة. الدراسة المورفولوجية والزراعية لهذه العزلات تصنفها إلى بكتيريا ذات نمو سريع و هذه سمة مميزة للجنس الريزوبيوم. الدراسة البيوكيميائية تقيم وجود نشاط الانزيمات المختلفة في اغلبية العزلات مثل اختزال النترات, اليورياز و السيلولاز. اظهرة النتائج ان هذه العزلات تفضل امتصاص للسكريات الثنائية و الكحولية. التوصيف المظهري عن طريق اختبارات تحمل الضغوط غير الحيوية (الملوحة, درجة الحموضة, درجة الحرارة) اظهر حد التحمل للعزلات على التوالي 5 للملوحة 28° لدرجة الحرارة و 11 لدرجة الحموضة. التوصيف التكافلي يبين تشكيل عقدات في 3 عزلات من اصل 5. وأخيرا بعد التوصيف الوراثي PCR / RFLP لم يتم العثور على التمييز بين 5 عزلات

الكلمات المفتاحية

البكتريا العصوية، عدسة *culinaris*، العقد الجذرية، التوصيف المظهري و الوراثي.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Le cycle d'azote (Dreo, 2006).....	4
Figure 2: Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et al., 2009).....	8
Figure 3 : Description morphologique de la lentille.....	10
Figure 4: Dialogue moléculaire <i>Rhizobium</i> -Légumineuse (Lindström et al., 2010).....	11
Figure 5 : les étapes du mécanisme de nodulation.....	13
Figure 6 : Symbiosome comportant deux bactéroïdes (Day et al., 2001).....	13
Figure 7: Localisation géographique indiquant la zone de prélèvement.....	16
Figure 8: Racines nodulées de la lentille	17
Figure 9: Conservation des nodules sous CaCl ₂ (Vincent, 1970).....	17
Figure 10: Méthode d'ensemencement des quadrants.....	19
Figure 11: Germination des graines.....	21
Figure 12: Test de nodulation.....	21
Figure 13 : Thermocycleur utilisé dans la réaction de PCR.....	24
Figure 14: Croissance des isolats sur différents milieux de culture.....	27
Figure 15: Aspect microscopique des colonies.....	27
Figure 16 : Croissance des isolats en présence de quelques sucres	30
Figure 17: Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl.....	30
Figure 18: Croissance des souches à des différentes températures	32
Figure 19 : Croissance des colonies a différents pH.....	34
Figure 20: Résultat du test du nitrate.....	34
Figure 21a: Acidification du milieu.....	36
Figure 21b: Alcalinisation du milieu.....	36
Figure 22 : Activité cellulolytique.....	36
Figure 23: Racines de <i>Lens culinaris</i> nodulées.....	38
Figure 24: Racines de <i>Lens culinaris</i> non nodulées.....	38
Figure 25: Profils électrophorétiques des produits d'amplification d'une partie de l'ADNr 16S sur gel d'agarose des isolats.....	40

Figure 26: Profils électrophorétiques de restriction enzymatique par l'enzyme EcoR1 par RFLP d'une partie de la région 16S de l'ADNr.....40



Liste des tableaux

Tableau 1: Croissance des souches en présence de différentes sources de carbone.....	28
Tableau 2: Croissance des 5 isolats à différentes concentrations de NaCl.....	29
Tableau 3: Croissance sur différentes température.....	31
Tableau 4: Croissance sur différentes pH.....	33

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNr: ADN ribosomique

ADP: Adenosine Diphosphate

ARN: Acide ribonucléique

atm: atmosphère

ATP: Adénosine Triphosphate

BET :Bromure d'éthydiu

BNL: Bactéries Nodulant les Légumineuses

BTB: Bleu de bromothymol

BTP: Pourpre de bromocrésol

CMC: Carboxy-méthyl-cellulose

GPA: Glucose Peptone Agar

LPS: Lipopolysaccharide

NaCl: Chlorure de sodium

Pb: Paire de base

PCR: Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérisation)

PFGE: pulsed-field gel electrophoresis.

R: *Rhizobium*

RC: Yeast-Mannitol-Agar + Rouge Congo

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des Fragments de restriction)

TBE: Tris Borate EDTA

TY: Tryptone Yeast Agar

UV: Ultra Violet

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast-Mannitol-Broth

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

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. La fixation de l'azote.....	3
1.1. Le cycle de l'azote.....	3
1.2. La fixation biologique de l'azote.....	4
1.3. Les fixateurs d'azote.....	4
2. La symbiose rhizobium - légumineuse.....	5
2.1 Généralités sur <i>Rhizobium</i>	6
2.1.1. Caractères morphologiques.....	6
2.1.2. Caractères biochimiques.....	6
2.1.3. Caractères physiologiques.....	6
2.1.4. Caractères culturels.....	7
2.1.5. Diversité taxonomique des rhizobiums.....	7
2.2. Légumineuses.....	8
2.2.1. Classification des légumineuses.....	8
2.3 Généralité sur <i>Lens culinaris</i>	9
3. Le processus de nodulation.....	11
3.1. Les signaux moléculaires.....	11
3.2. Mécanisme de la nodulation	12
3.2.1. Mode d'infection	12
3.2.2. Développement du nodule et maturation des bacteroïdes.....	12
4 -Méthodes d'études de la caractérisation des rhizobiums.....	14
4.1. Méthodes phénotypiques.....	14
4.2. Méthodes moléculaires.....	14

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	16
1.1. La collecte du nodule.....	16
1.2. Conservation des nodules.....	17
1.3. Isolement des bactéries.....	18
1.3.1 Réhydratation des nodules.....	18
1.3.2 Stérilisation des nodules	18
1.3.3 Ecrasement des nodules et isolement des bactéries.....	18
1.3.4. Purification des isolats.....	19
1.3.5. Examen microscopique par la coloration de Gram.....	19
1.4. Conservation des isolats.....	19
2. Test de nodulation.....	20
2.1. Stérilisation et germination des graines.....	20

2.2. Inoculation des graines.....	20
3. Caractères phénotypiques.....	21
3.1. Les tests physiologiques.....	21
3.1.1. Tolérance au chlorure de sodium (NaCl).....	21
3.1.2. Effet de la température.....	21
3.1.3. Effet du PH.....	21
3.2. Les tests biochimiques.....	21
3.2.1. Réduction des nitrates.....	22
3.2.2. Hydrolyse de l'urée.....	22
3.2.3. Activité cellulolytique.....	22
3.3. Les tests nutritionnelles: utilisation de la source de carbone	23
4. Caractérisation moléculaire par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADNr 16S.....	23
4.1. Extraction de l'ADN.....	23
4.2. Amplification d'une partie de l'ADNr 16S par PCR.....	23
4.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	24
4.4. Digestion des produits PCR par l'enzyme de restriction EcoR1.....	24
 Chapitre3 : Résultat et discussion	
1. Caractérisation phénotypique.....	26
1.1. Etude morphologique et culturale.....	26
1.2. Caractères microscopiques.....	26
1.3. Les tests nutritionnelles: utilisation de la source de carbone.....	28
1.4. Tests physiologiques.....	29
1.4.1. Tolérance à NaCl.....	29
1.4.2. Effet de la température.....	31
1.4.3. Effet du PH.....	33
1.5. Tests biochimiques.....	33
1.5.1. Réduction de nitrate.....	33
1.5.2. Hydrolyse de l'urée.....	35
1.5.3. Activité cellulolytique.....	35
2. Caractérisation symbiotique; test de nodulation.....	37
3. Caractérisation génotypique des isolats par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADNr 16S.....	39
3.1. Amplification par PCR d'une partie de l'ADNr 16S.....	39
3.2. Profils de restriction enzymatique d'une partie de la région 16S de l'ADNr..	39
 Conclusion.....	 41
Références bibliographiques.....	42
Annexes.....	45

INTRODUCTION

L'azote est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Malheureusement, la concentration de ses formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, etc.) est souvent insuffisante pour la bonne croissance des plantes constituant, de ce fait, le facteur clé de la production agricole.

Certaines plantes, notamment les légumineuses, établissent des relations symbiotiques avec des bactéries appelées rhizobiums, capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase. Cette symbiose constitue un procédé précieux permettant d'introduire de l'azote combiné dans les sols, pour les enrichir en azote et améliorer leur fertilité, réduisant ainsi l'utilisation des engrais chimiques.


La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine ou parfois sur la tige de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées nommées nodules (Dénarié et *al*, 1996). Au sein des nodules, la bactérie différenciée en bactéroïdes transforme l'azote de l'air en une forme directement assimilable par la plante. En échange la plante fournit à la bactérie les substrats carbonés issus de la photosynthèse.

En Algérie, la culture des légumineuses à graine constituent avec les céréales une composante de base dans les cultures traditionnelles importantes, qui sont le pois chiche, la lentille, la fève, la féverole, et le pois, ces légumineuses sont intégrées à la nutrition animale et humaine.

Notre travail consiste à étudier des bactéries nodulant les racines de la lentille (*Lens culinaris*). L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la région d'Ain Smara à Constantine.

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons procédé à une caractérisation phénotypique, génotypique et symbiotique des isolats nodulant *Lens culinaris* selon les étapes

- Isolement des bactéries à partir des nodules racinaires de la lentille ;
- Etude morphologique, culturale et microscopique des isolats ;
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests :
 - Nutritionnels (source de carbone).
 - Biochimiques (recherche de la nitrate réductase, l'uréase, la cellulase).
 - Physiologiques (effet du NaCl, pH, température).
- Authentification des isolats par le test de nodulation ;
- Caractérisation génotypique des isolats par PCR/RFLP d'une partie conservée de l'ADN 16S.



CHAPITRE 1
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. La fixation de l'azote:

L'azote est un élément indispensables à la vie, il est présent majoritairement dans son état standard N_2 dans l'environnement (Newton, 1998). C'est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques : les acides aminés et protéines en particulier. Le cycle d'azote est une succession de modifications subit par les différentes formes d'azote neutre pour les transformer en formes dites réactives (diazote, nitrate, nitrite, ammoniac, azote organique). Au cours de ce processus, les organismes vivants dans la rhizosphère vont pouvoir produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux.

1.1. Le cycle de l'azote:

Dans les sols bien oxygénés, des bactéries transforment l'ammoniac (NH_3) en nitrite (NO_2^-), puis en nitrates (NO_3^-), au cours du processus de nitrification. Les plantes symbiotes fournissent aux bactéries l'énergie nécessaire à la nitrification grâce aux glucides de la sève élaborée. Les racines absorbent alors les ions nitrate (NO_3^-) libérés par les bactéries et, dans une moindre mesure, l'ammonium présent dans le sol. Ils seront principalement incorporés dans les acides aminés et les protéines. Les végétaux constituent ainsi la source primaire d'azote assimilable par les animaux (Figure 1).

a) La nitrification

La nitrification est la conversion biologique de l'azote minéral réduit (NH_4^+) en azote minéral oxydé sous forme de NO_3^- en passant par le NO_2^- . C'est un processus d'oxydation contrôlé par certains microorganismes spécifiques, qui conduit la transformation de l'ion ammonium en nitrite, puis celle de nitrite en nitrate.

b) La dénitrification:

Il s'agit d'un procédé biologique où les bactéries dites dénitrifiantes en présence de la matière organique transforment les nitrates en diazote. Le diazote retourne alors dans l'atmosphère. Cette réaction chimique produit aussi du CO_2 et de l'oxyde d'azote (N_2O).

c) L'ammonification:

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH_4^+) sous l'action de microorganismes hétérotrophes car elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO_2^- en NO_3^- . Cette forme est transitoire et sera transformé ensuite en azote nitrique.

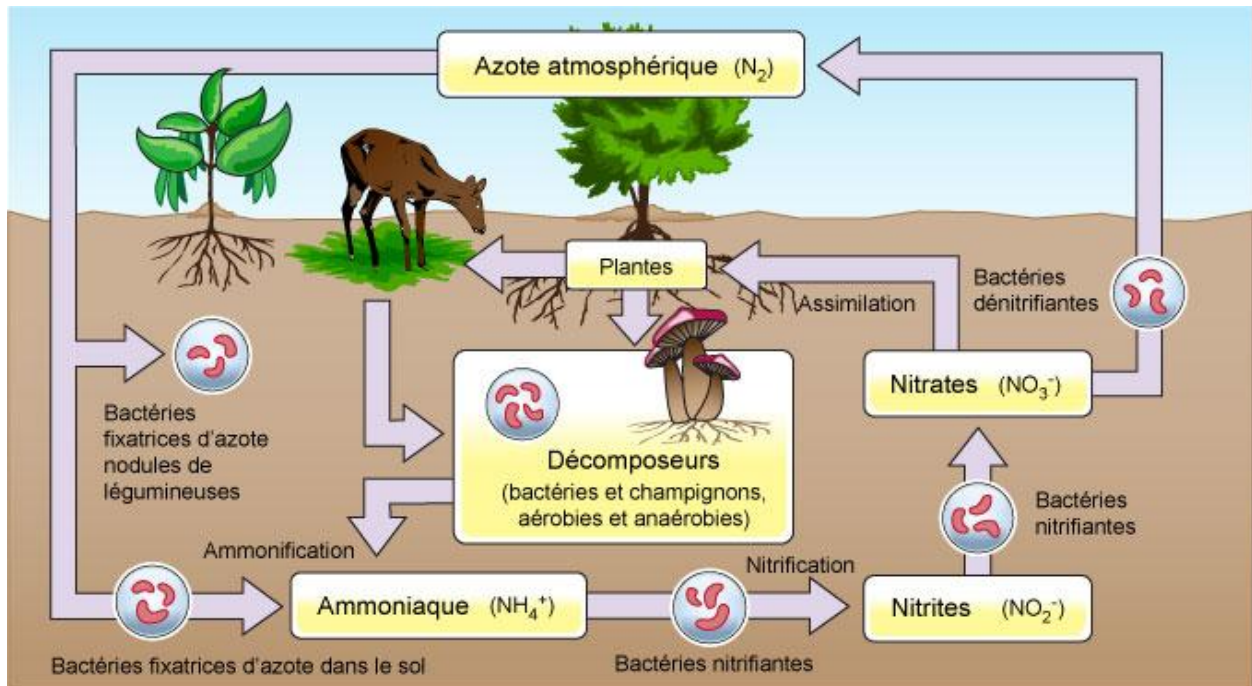


Figure 1: Le cycle d'azote (Dreo, 2006)

1.2. La fixation biologique de l'azote

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. C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en ammoniac. Cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004).

1.3. Les fixateurs d'azote

a) Les fixateurs libres

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces. Bien que certaines espèces soient aérobies par exemple *Azotobacter*, *Beijerinckia*; la plupart d'entre elles ne fixent l'azote que dans des conditions d'anaérobies ou dans des conditions de très

faibles pressions partielles d'oxygène. Elles comprennent des genres non photosynthétiques exemple: *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella* et des genres photosynthétiques exemple: *Chromatium*, *Rhodospirillum*. En plus de ces bactéries plusieurs genres de cyanobactéries principalement *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbia* et *Calothrix* comprennent des espèces fixatrices d'azote.

b) Les fixateurs symbiotiques

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. Chez les légumineuses le symbionte est une bactérie appelée *Rhizobium*. Curieusement on ne connaît qu'un seul genre n'appartenant pas aux légumineuses : *Parasponia* qui forme des nodules avec un symbionte du genre *Rhizobium*. (Duhoux et Nicole, 2004)

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. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse

En 1838 l'agronome français J.B.Boussingault montra que les légumineuses peuvent assimiler l'azote de l'air. En 1887, Hellriegel et Wilfarth ont montré que la fixation de l'azote atmosphérique est associé avec la nodulation des racines des légumineuses, cette fixation est liée à la présence de nodules appelés aussi nodosités sur leurs racines qui n'apparaissent qu'après infestation par des bactéries isolées par le Hollandais Beijerinck en 1888, les rhizobiums (Heller *et al.*, 1989).

L'association symbiotique est généralement très spécifique, chaque souche n'infecte qu'une espèce de plante ou une gamme très limitée d'hôte. Cette symbiose présente de nombreux avantages pour les légumineuses. En effet, celle-ci leur permet d'avoir une bonne croissance sur des sols carencés en azote. A l'opposé la plante subvient aux besoins énergétiques de la

bactérie au cours de cette symbiose en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse, elle lui offre également un microenvironnement très particulier et nécessaire à la fixation de l'azote (Duhoux et Nicole, 2004).

2.1. Généralités sur *Rhizobium*

2.1.1. Caractères morphologiques

Du grec rhiza qui signifie (racine) et bio (vie), *Rhizobium* signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Ce sont des bactéries Gram négatif, non sporulantes, on distingue deux formes :

- **La forme végétative:** les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobiums à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobiums à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **la forme bactéroïde:** à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994) (Duhoux et Nicole, 2004).

2.1.2. Caractères biochimiques

Les rhizobiums sont des bactéries hétérotrophes, ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.1.3. Caractères physiologiques

Rhizobium est un microorganisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6,8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.1.4. Caractères cultureux

Les rhizobiums à croissance rapide produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours. Les *Bradyrhizobium* à croissance lente. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours. Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobiums, sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaires, blanches, opaques ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pales rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

2.1.5. Diversité taxonomique des rhizobiums

La classification des rhizobiums est basée sur leur capacité symbiotique et leur spécificité d'hôte, toutes les bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses étaient classées en un seul genre *Rhizobium*. Aujourd'hui, le terme de bactérie nodulant les légumineuses (BNL) utilisé par Zakhia et al (2004) est plus adéquat et convient mieux que celui de rhizobiums qui dérive du nom du genre *Rhizobium*, pour désigner l'ensemble des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques capables d'entrer en symbiose avec les légumineuses.

Actuellement, les rhizobiums sont 13 genres et plus de 100 espèces symbiotiques appartenant aux sous classes alpha et beta Protéobactéries

(<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobiums>). Quatre genres d' α -Protéobactéries constituent les symbiotes majoritaires de la plupart des espèces de légumineuses rencontrées à travers le monde : *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) et *Bradyrhizobium*.

Toutefois il existe d'autres genres d' α -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*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, et *Shinella*. Au cours des dernières années des rhizobiums ont été aussi découverts dans les beta-Protéobactéries, dont les genres *Burkholderia sp* et *Cupriavidus* (Figure 2). La taxonomie des rhizobiums a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études.

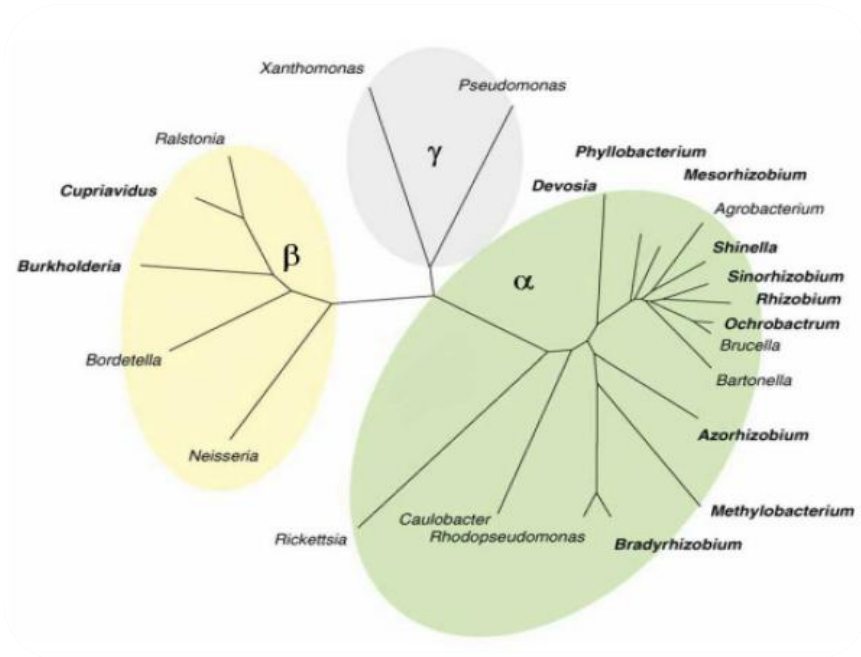


Figure 2 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et *al.*, 2009).

Rhizobiums associés à la lentille

Lens culinaris appartenant à la tribu des *Viciae* (*Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*...) a longtemps été considérées comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce bactérienne, *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae*. Cette classification a changé au cours des dernières années. Récemment de nouvelles espèces nodulant la lentille au Bangladesh ont été proposée tel que : *Rhizobium bangladeshense* et *Rhizobium binae* (Rashid et *al.*, 2015).

2.2. Légumineuses

2.2.1 Classification des légumineuses

Les légumineuses ou Fabacées représentent une famille importante et variée des Angiospermes. En effet, il s'agit de la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures avec plus de 720 genres et 20 000 espèces allant des espèces herbacées comme la luzerne, aux arbres composant les forêts tropicales d'Amérique Latine et d'Afrique comme les acacias. Classiquement les légumineuses sont divisées en trois sous-familles (Duhoux et Nicole, 2004).

Les caesalpinoideae: constituent 23% sont principalement de plantes ornementales et d'arbres à bois ou alimentaire

Les papilionoideae: représentent la sous-famille la plus diverse (97%). Il s'agit des légumineuses tempérées encore appelées Galégoïdes, avec les genres *Cicer* (pois chiche), *lens* (lentilles), *Lotus* (lotier), *medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilots), *Pisum* (pois), *Trifolium* (trèfle) et *Vicia* (vesce) etc. et des légumineuses tropicales ou Phaséolides avec notamment les genres *Phaseolus* (haricot), *Glycine* (soja), *Vigna* (vigne) et *Cajanus* (pois d'Angole).

Les mimosoideae: sont composés principalement des arbres tropicaux et subtropicaux avec notamment les genres *Acacia* et *Albizia*.

2.3 Généralité sur *Lens culinaris*

a) Taxonomie :

Domaine:	<i>Biota</i>
Règne :	<i>Plantae</i>
Classe:	<i>Equisetopsida</i>
Ordre:	<i>Fabales</i>
Famille:	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille:	<i>Faboideae</i>
Tribu:	<i>Fabeae</i>
Genre:	<i>Lens</i>
Espèce:	<i>Lens culinaris</i>

b) Description de la plante

La lentille cultivée (*Lens culinaris*) est une espèce de plantes dicotylédones annuelles appartenant à la famille des Fabaceae ou légumineuses, elle est probablement originaire d'Asie occidentale, d'où elle s'est diffusée vers la méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe (Brink et Belay, 2006).

-Description morphologique: La lentille est une plante annuelle herbacée de 20 à 72 cm de haut la Figure 3 montre les différentes étapes de la description morphologique de la lentille.

-Les tiges: sont dressées et très rameuses.

-Les feuilles: alternes, composées pennées, comptent de 10 à 14 folioles opposées, oblongues, et sont terminées par une vrille généralement simple ou bifide.

-**Les fleurs:** à la corolle papilionacée typique de la sous-famille des Faboideae, sont de couleur blanche ou bleu pâle et groupées par petites grappes de deux à quatre. Le calice est régulier, à cinq dents étroites et relativement longues. La floraison estivale intervient entre mai et juillet.

- **Les fruits:** sont des gousses aplaties, courtes, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé. La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé.....).

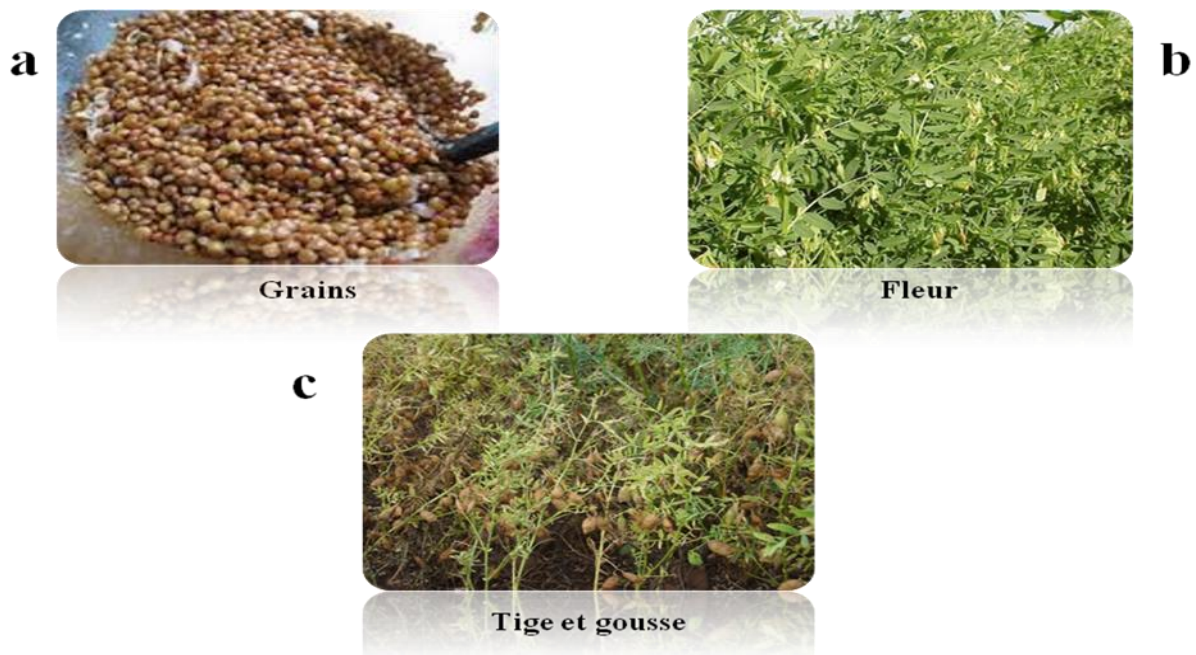


Figure 3: Description morphologique de la lentille

c) Intérêt de la lentille

La culture de la lentille enrichit le sol en azote, donc elle induit une diminution en apport en engrais azoté et assure un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation agricole et la diversification de la production agricole. La plante est surtout cultivée pour ses graines, récoltées et exportées comme aliment. Cependant, la paille est aussi utilisée, comme aliment de qualité supérieure pour le bétail ou comme source de matière organique pour l'amélioration des sols (Saskatchewan Pulse Growers, 2000). Les graines de lentille peuvent servir de nourriture parfois aux animaux, en particulier les volailles pour leur procurer des protéines. La lentille se cultive parfois pour le fourrage ou comme engrais vert (Brink et Belay, 2006).

3. Le processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par des signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérie

3.1 Les signaux moléculaires

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte, il s'agit d'un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie (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 rhizobiums 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).

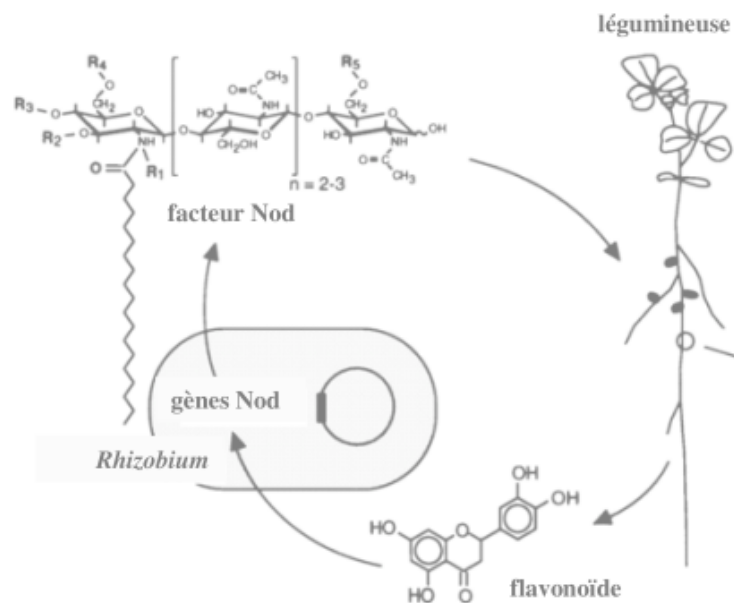


Figure 4: Dialogue moléculaire *Rhizobium*-Légumineuse (Lindström et al., 2010).

3.2. Mécanisme de la nodulation

3.2.1. Mode d'infection

La première étape de l'infection consiste à l'attachement des bactéries sur les jeunes poils absorbants au niveau de la zone susceptible à l'infection. Les bactéries se lient aux poils grâce à une protéine bactérienne appelée rhicadhésine. Des lectines végétales localisées à l'apex des poils sont également impliquées dans l'adhésion des bactéries. Une fois les bactéries fixées à l'apex du poil en croissance, elles vont induire par l'intermédiaire des facteurs Nod la courbure du poil absorbant en « cross de berger ». Au niveau de cette cross se développe une structure en forme de tube appelée cordon d'infection qui progresse jusqu'au cortex interne de la racine. Simultanément à la mise en place de ce cordon, les cellules du cortex se divisent et forment un primordium nodulaire (Figure 5) (Smit *et al.* 1986 ; (Duhoux et Nicole, 2004).

3.2.2 Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Une fois toutes les structures en place, les bactéries entrent dans la racine cheminant le long du cordon d'infection jusqu'au niveau du primordium nodulaire ou elles prolifèrent rapidement et prennent des formes plus ou moins globuleuse, boursoufflées parfois branchées devenant ainsi des bactéroïdes. Les bactéroïdes sont enfermés dans des vésicules limitées par une membrane dérivant de la cellule végétale nommée membrane péribactéroïdienne pour former un ensemble nommé symbiosome (Figure 6) (Hopkins *et al.*, 2003). La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et des cellules corticales des racines produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosités. Le nombre de nodules et leurs masses sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux., 2004).

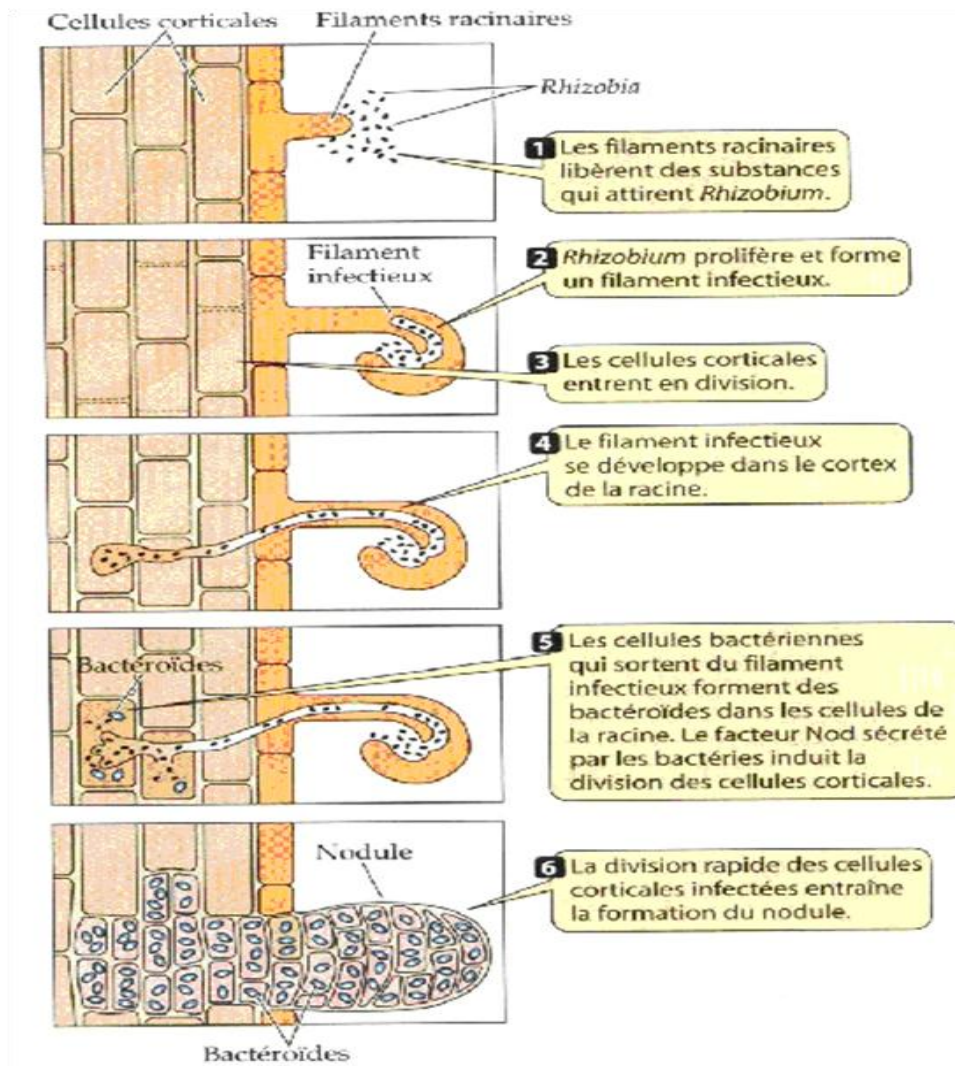


Figure5: les étapes du mécanisme de nodulation

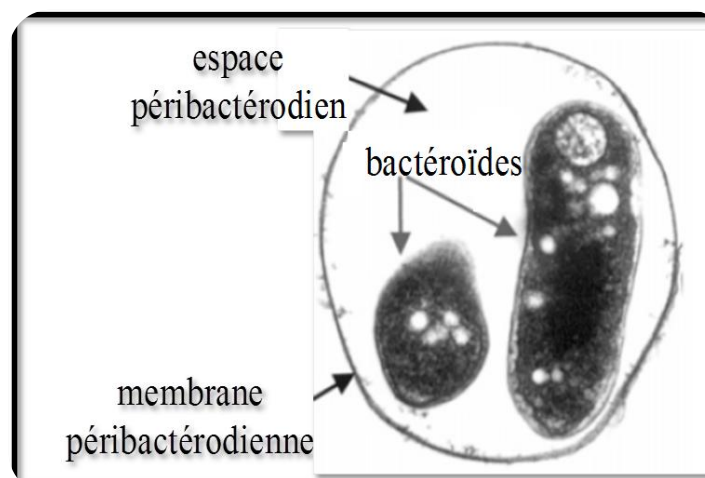
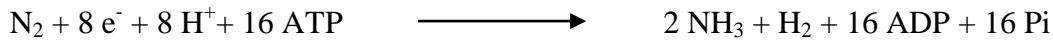


Figure 6- Symbiosome comportant deux bactéroïdes (Day *et al.*, 2001)

a) La fixation biologique de l'azote

La nitrogénase a pour but la fixation biologique de l'azote par la réaction de Haber-Bosh. Cette réduction se fait par un transfert d'électron qui s'effectue entre la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase et elle nécessite de l'ATP :



La dinitrogénase est une Ferro protéine et elle est très sensible au dioxygène. Tous les microorganismes fixateurs d'azote ont en commun un complexe de gènes (le complexe *nif* nitrogène *fix*) qui code pour la synthèse du nitrogène et pour la protéine qui interviennent dans l'activité de la nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004).

b) La léghémoglobine

La léghémoglobine est une protéine présente uniquement dans les nodosités racinaires. Elle donne une couleur rose aux nodosités racinaires et fonctionne comme un transporteur d'oxygène, facilitant ainsi la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes. Elle maintient une faible pression d'oxygène car la nitrogénase bactérienne est très sensible à une concentration élevée d'oxygène (Ott et *al.*, 2005).

4 -Méthodes d'études de la caractérisation des rhizobiums

4.1. Méthodes phénotypiques

La caractérisation phénotypique classique des rhizobiums 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, 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)

4.2. 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 rhizobiums 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'ADN 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'ADN 16S est devenu le marqueur taxonomique le plus important chez les rhizobiums 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 rhizobiums (Laguerre *et al.* 1994).



CHAPITRE 2
Matériel et méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules à partir des racines de la lentille a été réalisée au début mars à partir des racines de la lentille cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine (Figure 7).

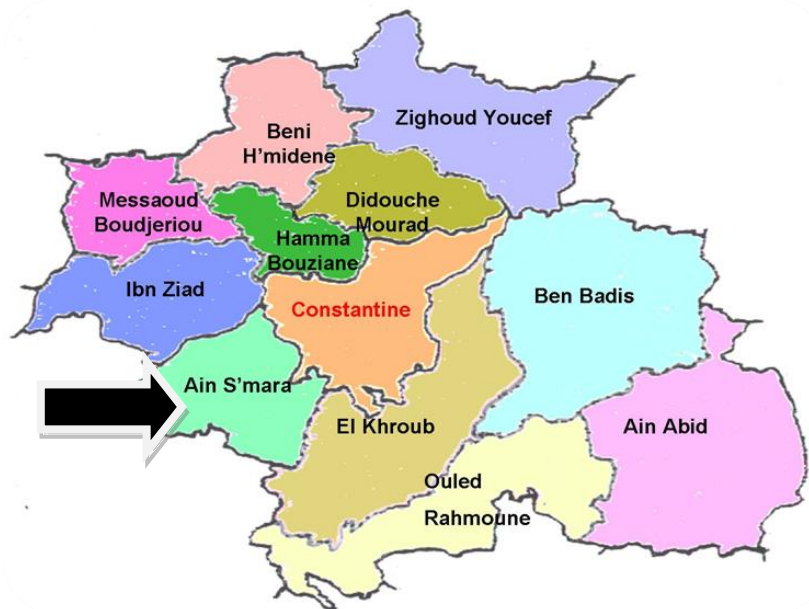


Figure7 : Localisation géographique indiquant la zone de prélèvement

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

- creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire ;
- se débarrasser de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules ;
- placer le tout dans un sac en plastique qu'on achemine au laboratoire ;
- au laboratoire, les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet (Figure 8) ;
- Les nodosités sont détachées à 1-2mm du site d'attache puis rincées et séchées par papier filtre.



Figure8: Racines nodulées de la lentille

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, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de Calcium (CaCl_2) (Vincent, 1970). Les nodules seront déposés sur une couche de coton dans un flacon contenant du CaCl_2 (Figure 9). Le flacon est étiqueté et porte les informations suivantes: le nom de la plante, la date et le lieu de la collecte et la date de conservation.

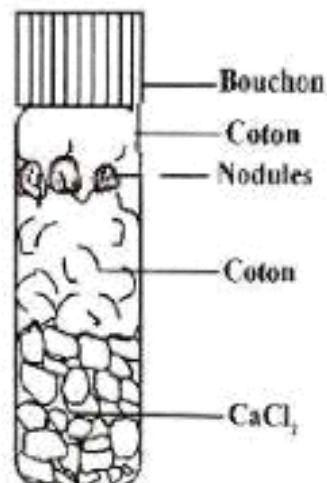


Figure 9: Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

1.3. Isolement des bactéries

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

Une fois que les nodosités ont repris leur volume initial; celles-ci sont désinfectées par l'alcool 95 % pendant 10 secondes puis, par une solution aqueuse saturée d'hypochlorite de calcium pendant 3 minutes. Après une série de 10 rinçages à l'eau distillée stérile, les nodules sont laissés à gonfler dans la dernière eau de rinçage pendant une heure. Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

1.3.3. Ecrasement des nodules et isolement des bactéries

L'isolement a été réalisé selon la méthode de Vincent (1970) dans des conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire. La procédure suivie est la suivante :

- déposer 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile dans une boîte de pétri stérile ;
- un nodule stérile est déposé dans chaque goutte d'eau, qu'on écrase à l'aide d'une pince préalablement stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.
- prélever la suspension obtenue (jus de nodule) à l'aide d'une anse de platine stérile qu'on ensemence directement sur les milieux suivants:

YMA + RC (Yeast Manitol Agar) (annexe1)

YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Blue) (annexe1)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar + Bromocrésol Pourpre) (annexe1)

- L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrants de manière à isoler des simples colonies (Figure 10). Les boîtes de pétri sont incubées pendant 24 à 48 heures à 30°C.

L'utilisation d'un milieu gélosé au cours de la phase d'isolement permet de différencier chaque isolat issu d'un même nodule, de localiser et d'éliminer les éventuels contaminants, ce qui est impossible avec un milieu liquide.

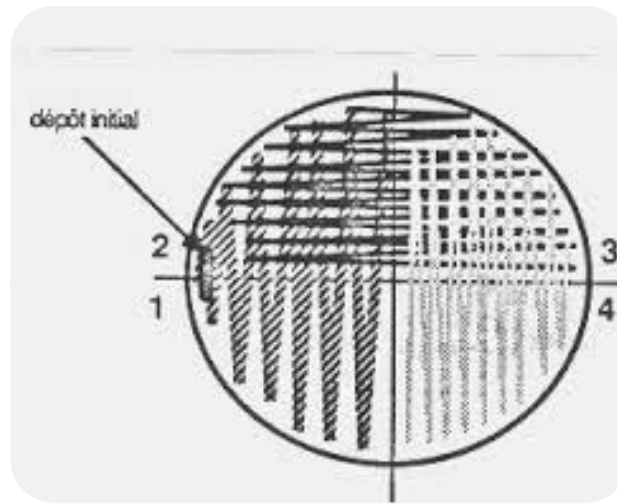


Figure 10 : Méthode d'ensemencement des quadrants

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 (Annexe3).

1.4. Conservation des isolats

La conservation des isolats a été réalisée sur le milieu YMA additionnée de 3 g/l de CaCO_3 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

Après l'isolement des bactéries, un test de nodulation a été réalisé pour identifier les 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

La culture de la lentille a été réalisée dans des tubes. Des graines non endommagés et de taille identique ont été réhydratées dans l'eau distillée pendant une nuit, puis désinfectées avec de l'éthanol (95%) pendant 10 secondes, ensuite dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 5min. elles sont rincées 10 fois à l'eau distillée stérile et laissées dans la dernière eau de rinçage pendant 1 heure, puis mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée semi solide (10g/l d'agar) à température ambiante pendant 2 – 3 jours (Figure 11).

2.2. Inoculation des graines

Les graines germées sont transférées dans des tubes qui seront bien fermés avec du papier aluminium, stérilisés dans l'autoclave, puis remplis de solution nutritive de Fahraeus additionnée de CaCO_3 à 1% (annexe2).

Dès l'apparition des radicules, on inocule avec 1 ml d'une suspension bactérienne ($\sim 10^7$ cellules) des cellules jeunes. Enfin les plantes sont placées dans une 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 (Figure12). Le développement des nodules a été suivi au cours des 4 premières semaines après inoculation.



Figure11: Germination des graines

Figure12: Test de nodulation

3. Caractères phénotypiques

Nos isolats ont subi quelques tests phénotypiques, dans le but d'évaluer leurs caractères morphologiques, culturales, physiologiques et biochimiques.

3.1. Tests physiologiques

3.1.1. Tolérance au chlorure de sodium (NaCl)

Les isolats ont été cultivés sur milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl (1%, 2%, 3%, 5%, 10%), puis incubés à 28°C pendant 72 heures.

3.1.2. Effet de la température

Dans le but de déterminer la température maximale de croissance, les isolats ont été cultivés sur milieu YMA et incubés pendant 72h à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 44°C.

3.1.3. Effet du pH :

Afin d'évaluer le PH optimal de croissance, les isolats sont cultivés sur milieu YMA, avec différents PH (4, 5.5, 6.8, 9, 11).

3.2. Tests biochimiques

Le but des tests biochimiques est de rechercher la présence de certaines enzymes qui jouent un rôle lors du processus d'infection des racines par les bactéries.

3.2.1. Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Beringer, 1974) (Annexes 1) contenant 0,1% de KNO_3 (p/v) pendant 4 jours avec agitation à 28°C. Après incubation, on ajoute dans chaque tube le réactif nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique à 3% préparé dans l'acide acétique 5XM) et le réactif nitrate réductase 2 (a-naphtylamine à 0,5% préparé dans l'acide acétique 5XM). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition de la poudre de zinc pour vérifier la présence de nitrate dans le milieu ou non, après quelques minutes, l'apparition d'une tinte rouge signifie la présence des ions nitrate dans le milieu donc le résultat est négatif. Si l'on n'observe pas une coloration rouge l'absence des ions nitrate dans le milieu indique un résultat positif. (Guiraud, 1998).

3.2.2. Hydrolyse de l'urée (Somasegaran et Hoben, 1994)

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20min puis refroidi, auquel on rajoute la solution d'urée stérilisée par filtration. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures. 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 l'alcalinisation du milieu.

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

Les isolats cultivés sur milieu YMB sont ensemencées sur YMA contenant 0.25% de CMC (Annexe 1). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 30°C. La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M à une

température ambiante pendant 30min. Un halo jaune-orangé entoure les colonies qui montrent une activité d'une endoglucanase indique la présence d'une cellulase.

3.3. 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.

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. Ces cellules traitées peuvent être conservés plusieurs semaines à - 20°C. 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 (Taille de l'amplicon : 450 pb) 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 MgCl₂, 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, 8µl 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 EcoR1

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 choisi est EcoR1, qui reconnaît le site de restriction de la séquence suivante :



Un mélange réactionnel d'un volume final de 10 µl a été préparé par 1 µl de tampon réactionnel 10X spécifique de l'enzyme EcoR1 (Promega), 10 U d'enzyme (1 µl), 8µL de produits PCR. La digestion a été réalisée à 37°C pendant une nuit. Les fragments de restriction obtenus après ajout de 2 µl de tampon de charge ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% (Promega USA) dans lequel ont été ajoutés 4µl 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 que 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 3

Résultats et discussions

1. Caractérisation phénotypique

1.1. Etude morphologique et culturale

Afin d'identifier les isolats nodulant la lentille (*Lens culinaris*), nous nous sommes basé sur l'étude des caractéristiques morphologiques et culturales des colonies poussant sur différents milieux sélectifs pour la croissance de *Rhizobium*.

a) Croissance sur milieu YMA

Sur le milieu YMA, les colonies apparaissent avec une couleur crème ou blanche, de taille variable ayant une forme circulaire bombée à bords réguliers, de texture translucide, surface lisse et brillante. Ces colonies sont visibles après 48h-72h d'incubation (figure 14a).

b) Croissance sur 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). Ceci confirme la pureté des colonies, en présence des contaminants, les colonies absorbent le rouge Congo et apparaissent de couleur rouge.

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

Après 48h d'incubation, on observe l'apparition des colonies avec virage du milieu vers la couleur jaune, indiquant une production d'acide par le bleu de bromothymol, c'est une caractéristique des bactéries à croissance rapide (figure 14c). Contrairement aux souches à croissance lente qui alcalinisent le milieu de culture.

d) Croissance sur milieu GPA+pourpre de Bromocrésol

La culture des souches sur ce milieu n'a pas montrée un virage de la couleur du milieu, ce qui élimine la possibilité de présence de contaminants (figure 14d). Généralement ce milieu est utilisé pour le contrôle de la pureté des isolats.

1.2. Caractérisation microscopique:

L'observation microscopique de nos isolats a permis d'observer des bâtonnets Gram négatif (figure 15), Compatible avec la coloration de Gram des rhizobia (Vincent (1970).

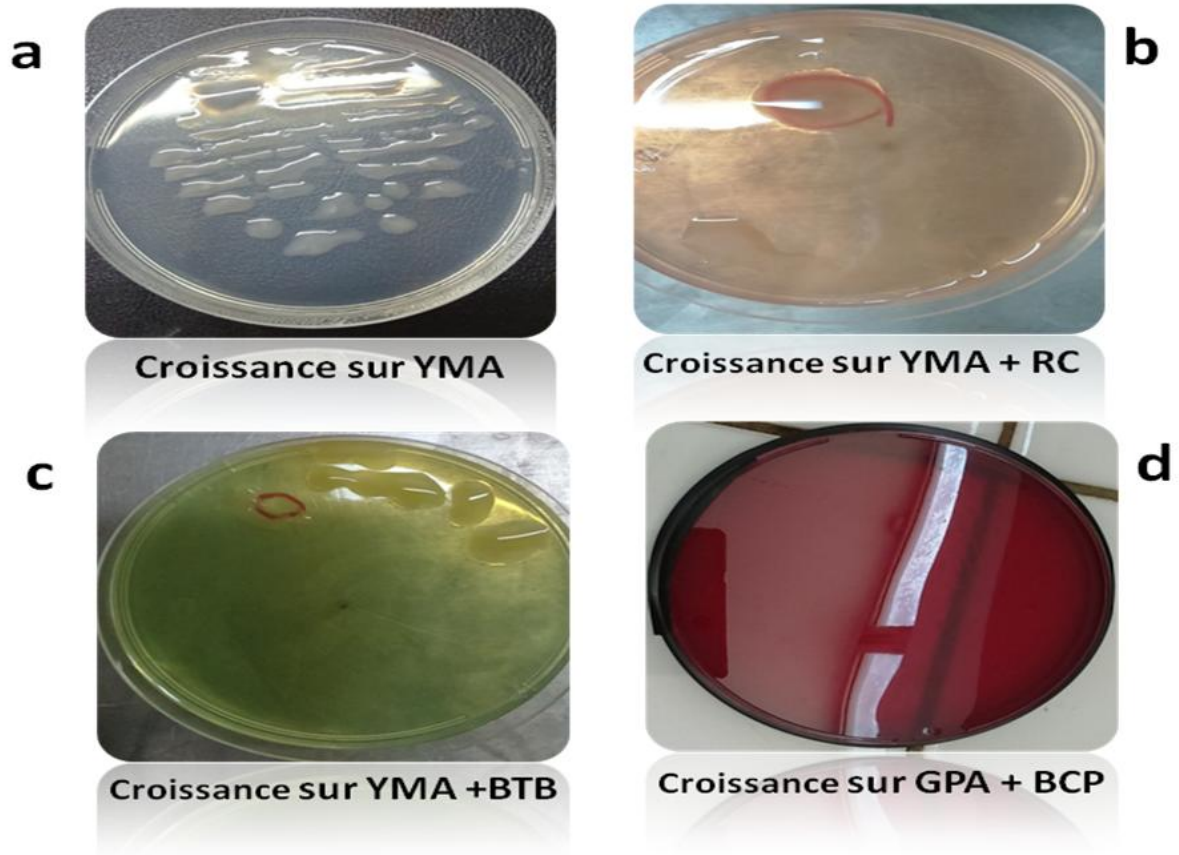


Figure 14: Croissance des isolats sur différents milieux de culture

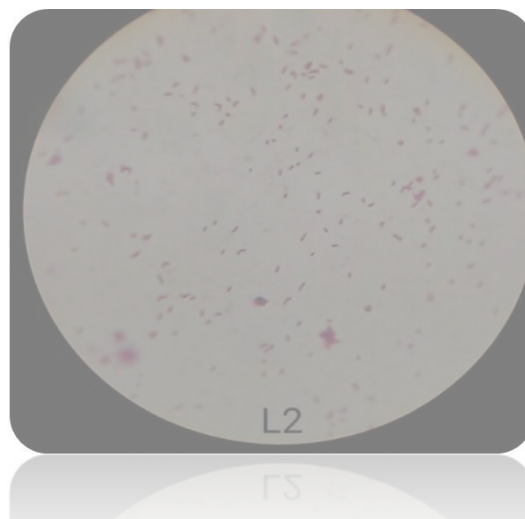


Figure 15: Aspect microscopique des colonies

Ces résultats de caractérisation morphologique, culturale et microscopique sont en concordance avec ceux trouvés par Vincent (1970), Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1987). Et de ce fait nous avons sélectionné 5 isolats nodulant *Lens culinaris* cultivé dans la région d'Ain Smara à Constantine, qui peuvent appartenir au genre *Rhizobium*. Ces isolats ont été nommés L1, L2, L4, L9 et L11. D'autres tests phénotypiques ont été nécessaires pour compléter ces résultats.

1.3. Test nutritionnel : utilisation de la Source de carbone

Les résultats indiqués dans le tableau 1 montrent que les isolats différents dans leur aptitude à assimiler les différents sucres. La figure 16 montre quelques exemples de croissance des bactéries en présence de certains sucres. Tous les isolats présentent une très bonne croissance en utilisant les disaccharides (lactose et saccharose) (Figure 16a) et le sucre alcool (mannitol) comme source de carbone. Par contre les isolats montrent une bonne croissance ou faible en présence du disaccharide (maltose) et du sorbitol (Figure 16b). La majorité des bactéries sont incapables de pousser en présence du fructose (cétohexose)(Figure 16c). Plusieurs études ont été réalisées sur la variabilité de la nutrition carbonée chez les *Rhizobia* (Graham, 1964; Zhang et al, 1991; Stowers et Eaglesham, 1984). Il a été montré que les souches à croissance rapide possèdent une préférence pour les disaccharides (Stowers, 1985; van Rossum et al, 1995), ce qui est en accord avec nos résultats.

Tableau 1: Croissance des souches en présence de différents sucres

Sucre Isolats	Saccharose	Sorbitol	Mannitol	Maltose	Lactose	Fructose
L1	+++	++	+++	++	+++	-
L2	+++	++	+++	+	+++	-
L4	+++	++	+++	+	+++	-
L9	+++	++	+++	++	+++	-
L11	+++	++	+++	+	+++	-

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

1.4. Tests physiologiques

1.4.1. Tolérance au NaCl

Nous avons rassemblé dans le tableau 3 les résultats du test de NaCl. Tous nos isolats ont toléré une concentration de 1% et 2%, à l'exception de l'isolat L11, qui a poussé qu'en présence de 1% de NaCl. Lindström et Lehtomäki (1988) ont rapporté que seulement 3 sur 13 souches de *Rhizobium leguminosarum* ont poussé à 2% de NaCl. Une Croissance faible à 3% et 5% a été observé et aucune croissance à 10% (Figure 17a). Ces résultats rejoignent ceux d'El essaoui et AbdelGhaffer (1967) qui ont sélectionné des souches de *Rhizobium leguminosarum* poussant dans un bouillon de culture contenant 5% de NaCl.

Tableau 2: Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl

[NaCl]	1%	2%	3%	5%	10%
Souches					
L1	+++	+++	++	++	-
L2	+++	+++	++	++	-
L4	+++	+++	++	++	-
L9	+++	+++	++	++	-
L11	++	+	-	-	-

+++ : Très bonne croissance

++ : Bonne croissance

+ : Faible croissance

- : Absence de croissance

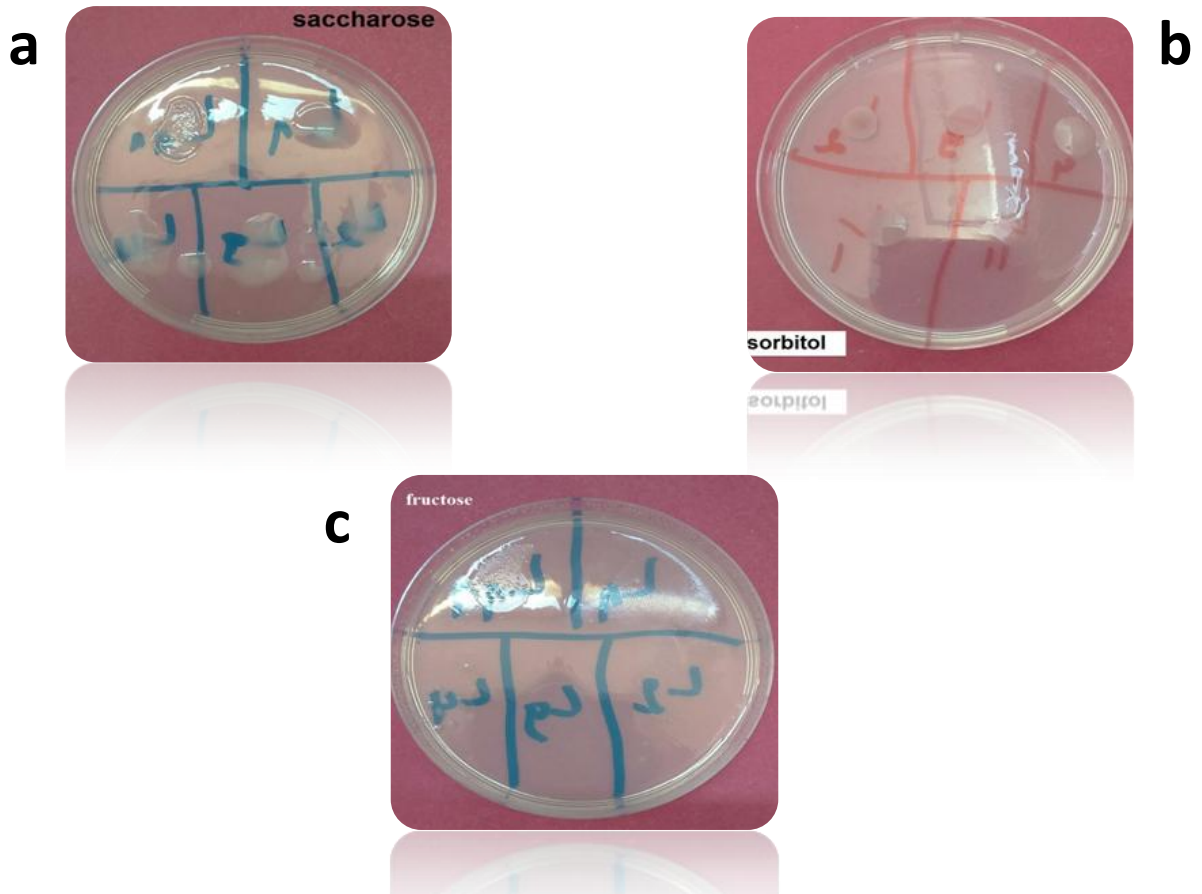


Figure 16: Croissance des isolats en présence de quelques sucres

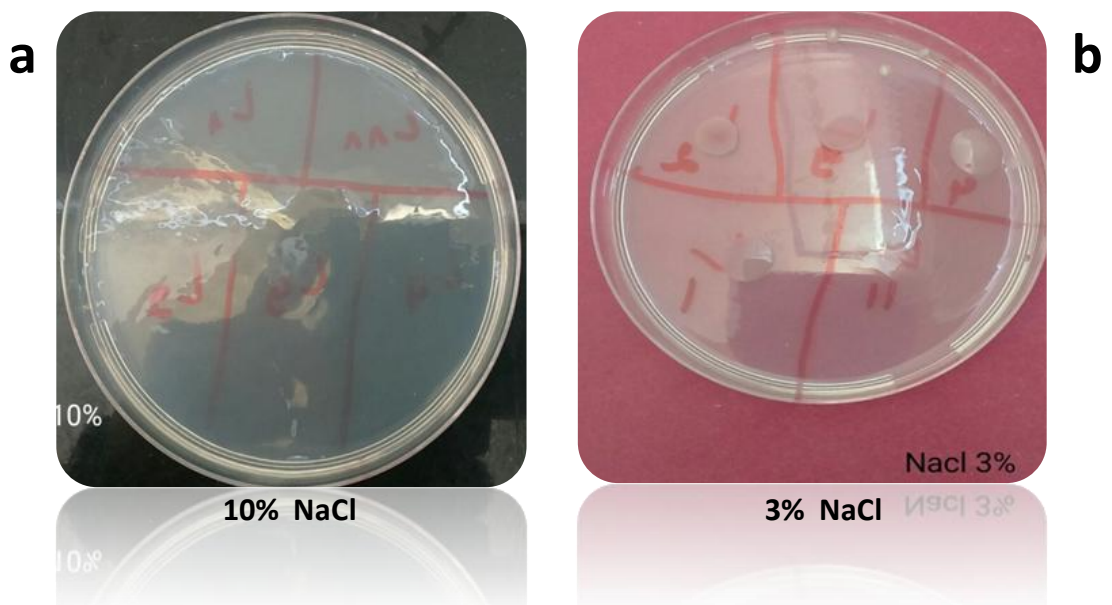


Figure 17: Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl

1.4.2. Effet de la température Les résultats de l'étude de la température sont présentés dans le tableau 3. Après 72 heures d'incubation on n'observe aucune croissance à 4°C (figure 18c). Ceci a été souligné par Jordan (1984), qui a constaté que la croissance des rhizobia est très rare à cette température. Tous les isolats présentent une meilleure croissance à 28 °C (figure 18b), ceci a été souligné par Graham (1992) qui a rapporté que la température optimale de croissance est située entre 28°C et 31 °C. Aucun isolat n'a poussé à 37 °C et 44 °C (Figure 18c). 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 3: Croissance sur différentes température

T°C	4C°	20C°	28C°	37C°	44C°
Souches					
L1	-	+	+++	-	-
L2	-	-	+++	-	-
L4	-	-	+++	-	-
L9	-	+	+++	-	-
L11	-	+	+++	-	-

+++ : Très bonne croissance

++ : Bonne croissance

+ : Faible croissance

- : Absence de croissance

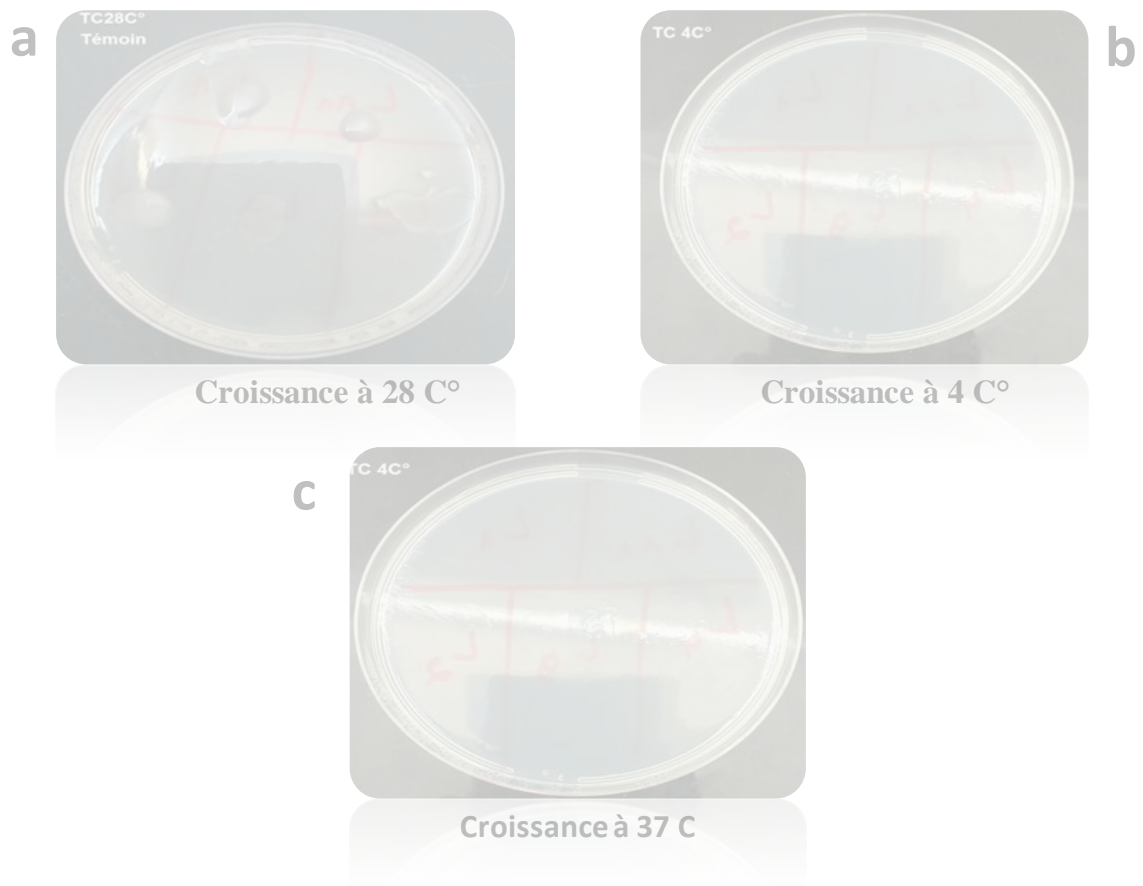


Figure 18: Croissance des souches à des différentes températures

1.4.3 Effet du pH

Les résultats de l'étude du pH sont présentés dans le tableau 4. Tous les isolats sont capables de croître dans un intervalle de pH allant de 5,5 à 11 avec un optimum de croissance à pH = 6,8 (Figure 19a). Ceci confirme les constatations de Vincent (1970) et Jordan (1984) pour le pH optimum de croissance des rhizobia. On note une absence de croissance pour tous les isolats à pH = 4. D'après Graham *et al.* (1994) peu de rhizobia poussent à pH < 5. Dans les milieux alcalins ou la valeur de pH = 9 et pH = 11 (Figure 19b, c), on observe une tolérance chez tous les isolats. Il est remarqué que nos isolats varient dans leur tolérance au pH, ceci soutient l'observation donnée par Graham *et al.* (1994).

Tableau 4: Croissance des isolats à différents pH

pH / Souches	4	5.5	6.8	9	11
L1	-	+++	+++	+++	+++
L2	-	+++	+++	+++	++
L4	-	++	+++	++	++
L9	-	++	+++	++	++
L11	-	++	+++	++	++

+++ : Très bonne croissance

++ : Bonne croissance

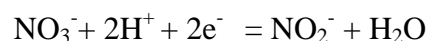
+ : Faible croissance

- : Absence de croissance

1.5. Tests biochimiques

1.5.1 Réduction des nitrates

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites (réaction ci-dessous), qui donnent une réaction colorée 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 réactifs nitrate I et II à la culture bactérienne, on observe un virage de la couleur du milieu vers le rouge (Figure 20), ceci signifie que tous nos isolats

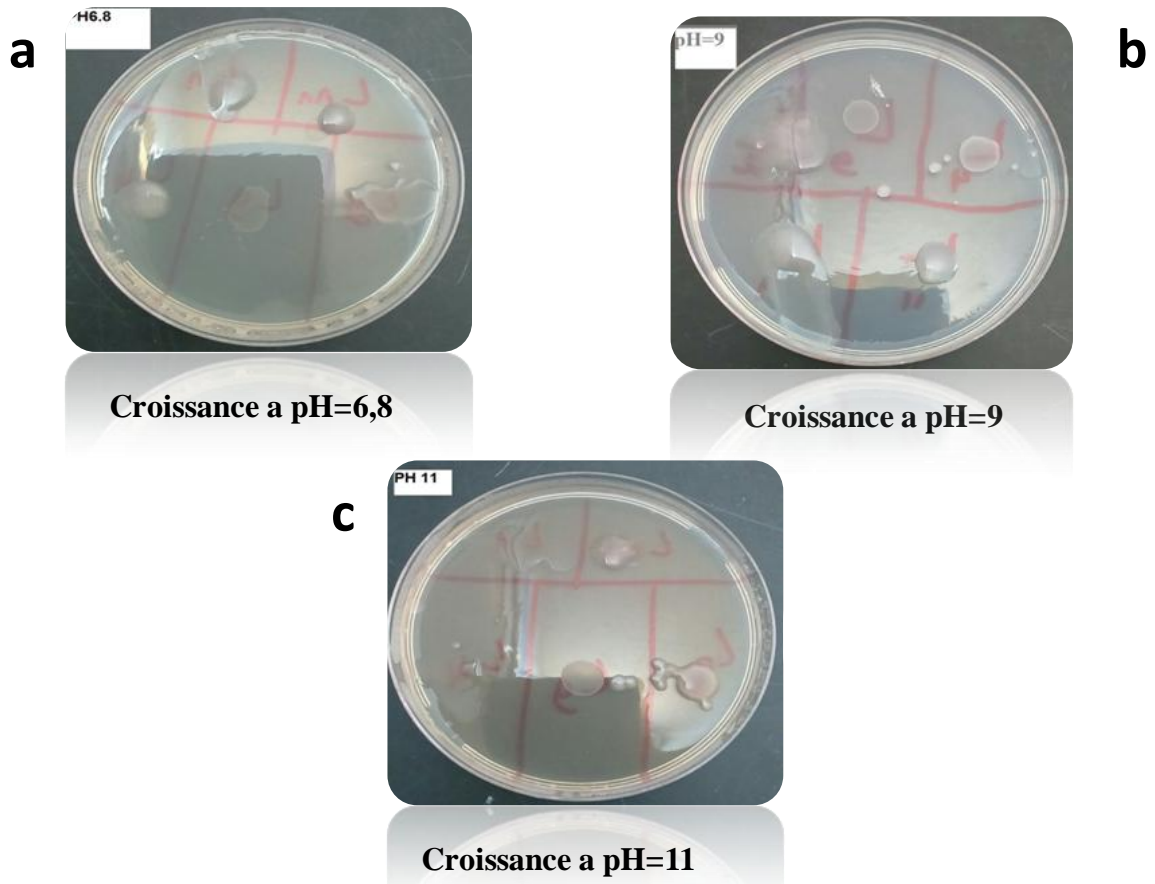


Figure19: Croissance des isolats a différents pH



Figure20: Réduction des nitrates

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 réagi 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 plus part des microorganismes et des plantes (El Hilali, 2006). La présence des nitrates dans le sol affecte la capacité de l'infectivité des racines des légumineuses par les rhizobia.

1.5.2 Hydrolyse de l'urée:

Seules les souches L1 et L9 qui présentent une activité uréase par le virage de la couleur du milieu urée indole vers le rose violet (Figure 21b), ce qui indique l'alcalinisation du milieu, en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu de culture suite à 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 (Guirand, 1998). L'urée est catalysée par l'uréase, il ya production de dioxyde de carbone et d'ammoniac. Par contre L2, L4, L11 n'ont donné aucune alcalinisation du milieu, ce qui indique l'absence de l'activité uréolytique chez ces isolats (Figure 21a).

L'activité de l'uréase est largement distribuée dans le sol et l'environnement aquatique, ou elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme d'azote des plantes, algues, quelques invertébrés, des mycètes ainsi que les procaryotes (bactéries) (Palinska et *al.*, 2000).

1.5.3. Activité cellulolytique

L'hydrolyse de carboxy-methyl-cellulose (le composant fondamental de la paroi végétale) se manifeste par un halo jaune orangé autour des colonies après coloration au rouge Congo. Tous nos isolats ont montré une activité cellulolytique (Figure22), donc ces bactéries ont la capacité de dégradé la cellulose. Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Struffi et *al.*, (1988). 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).

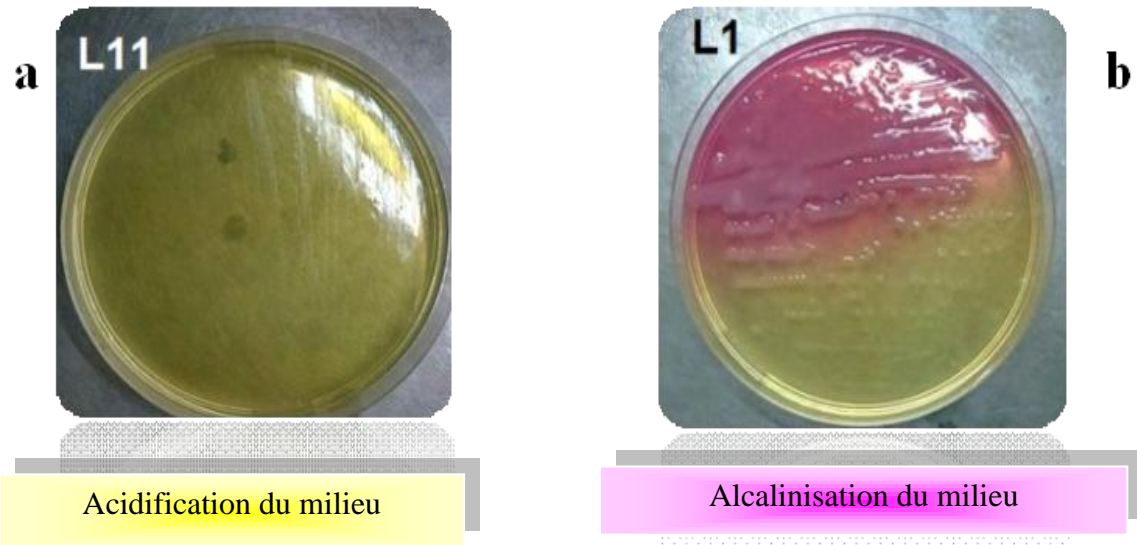


Figure21: Hydrolyse de l'urée

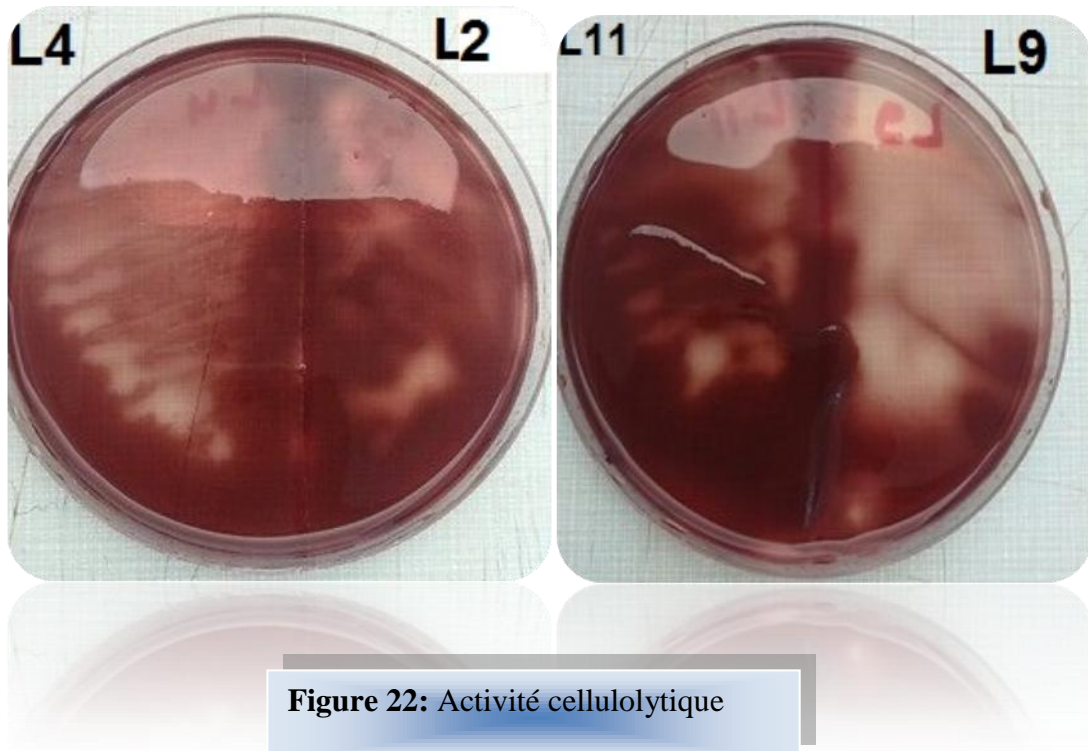


Figure 22: Activité cellulolytique

2. Caractérisation symbiotique : test de nodulation

Chaque isolat caractérisé morphologiquement a été testé pour sa capacité de noduler la plante hôte. Après 4 semaines de croissance des plantes en tubes (Figure23), 3 isolats (L1, L4 et L11) ont pu noduler les racines de la plante hôte. Ces isolats ont montré une faible infectivité avec des nodules de petite taille, de couleur blanche à rose claire. Pour les souches L2, L9 ainsi que le témoin, on n'a pas observé une formation de nodule (figure24) après la même période de croissance. Ce résultat non espéré qui s'explique par une croissance limitée des plantes est probablement du aux conditions défavorables de photopériode, d'humidité, etc., ainsi ces isolats ont probablement perdu leur pouvoir de nodulation.

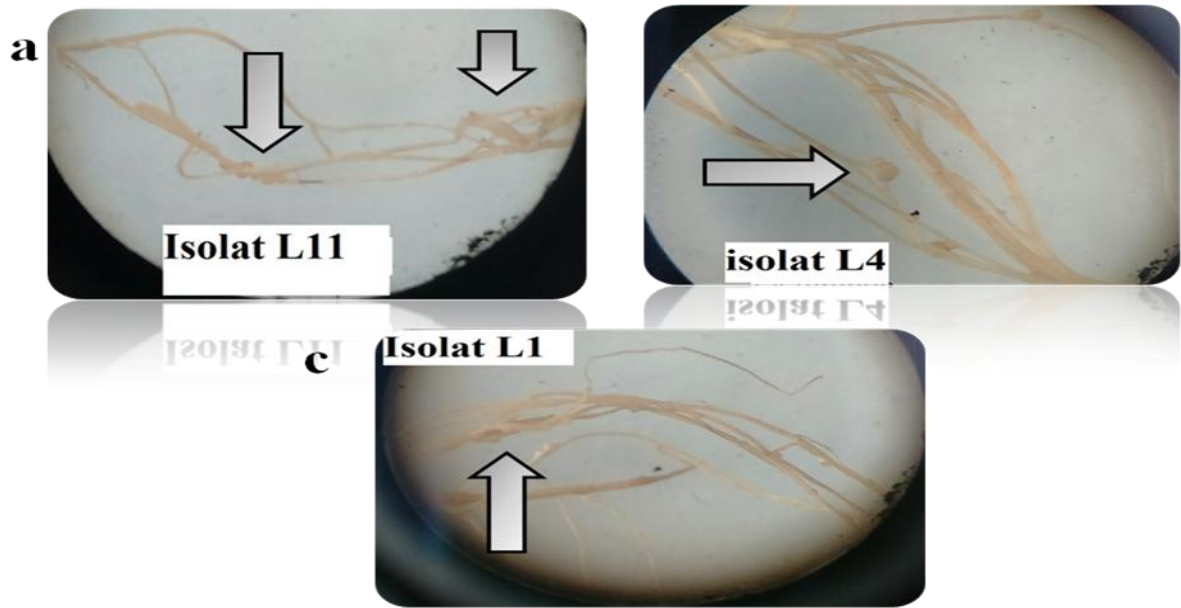


Figure 23: Racines nodulées de *Lens culinaris*

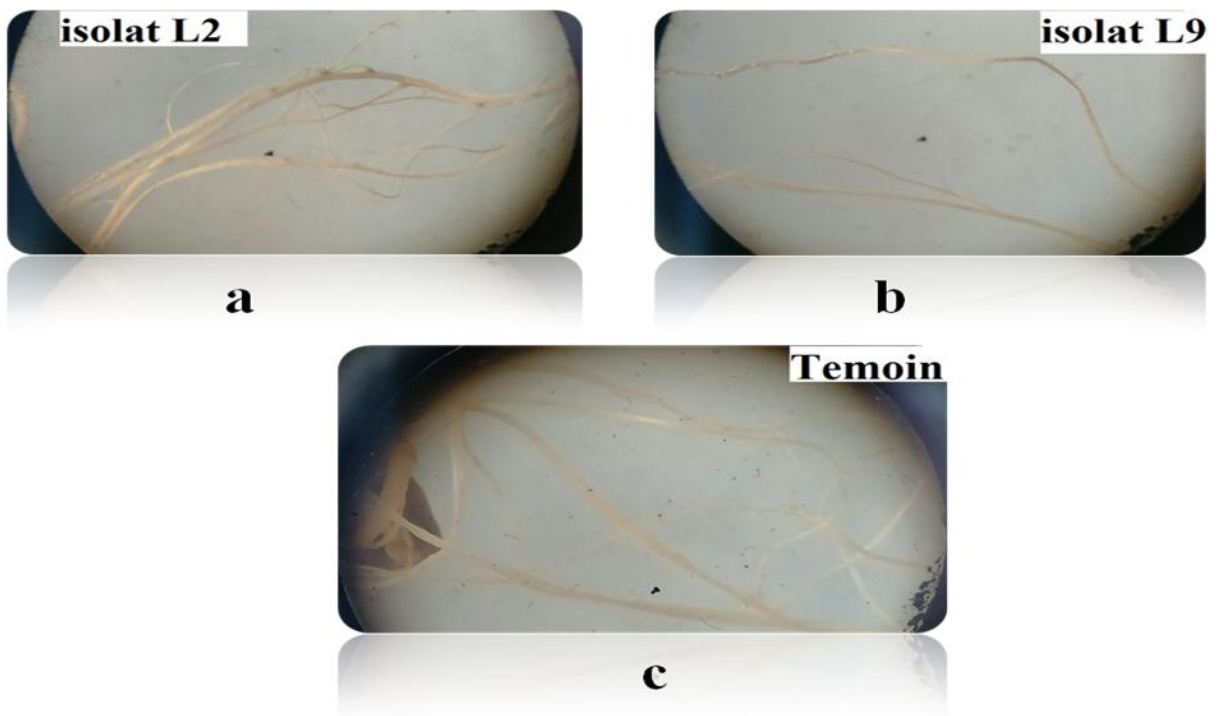


Figure 24: Racines non nodulées de *Lens culinaris*

3-Caractérisation génotypique des isolats par PCR/RFLP d'une partie conservée 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 plus 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 cinq isolats, tout les cinq ont pu s'amplifier et donner chacun une seule bande dont la taille est proche de 600 paires de bases (Figure 25).

Les termes de « 16S court » et « 16S long » sont utilisés dans le langage courant des microbiologistes pour faire référence à différentes longueurs de séquences amplifiées. « 16S court » fait référence à l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ADN 16S, le plus souvent les 500 premiers nucléotides. Pour la plupart 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)

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 EcoR1 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 5 isolats (Figure 26). Ceci s'explique par le fait que les 5 fragments d'ADN n'ont pas été coupés par EcoR1, et de ce fait on n'observe aucune discrimination entre les isolats. Cette enzyme n'a pas été efficace et l'application d'autres enzymes de restriction seront nécessaires pour vérifier s'il existe un polymorphisme concernant cette région courte d'ADNr 16S entre nos isolats.

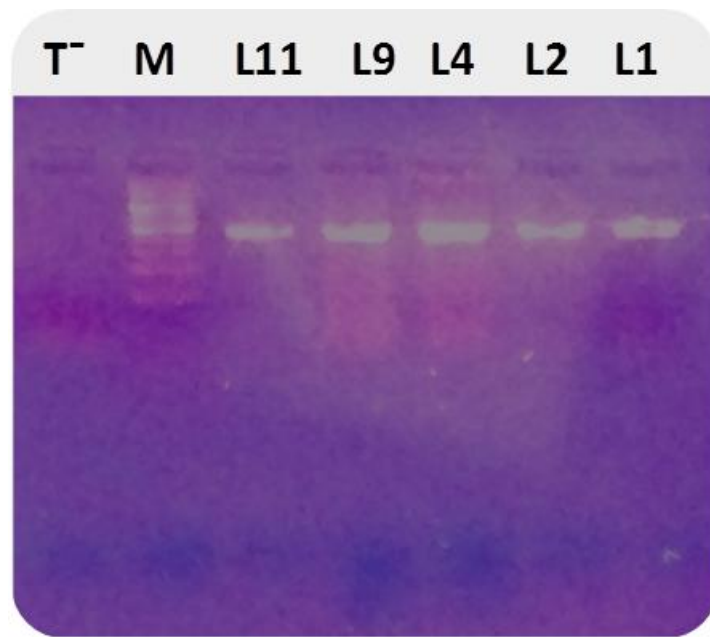


Figure25: Profils électrophorétiques des produits d'amplification d'une partie de l'ADNr 16S sur gel d'agarose

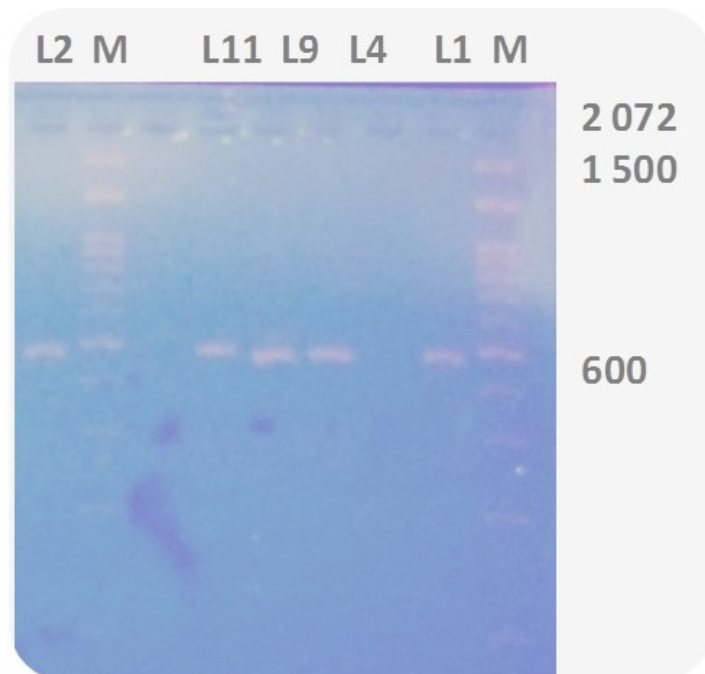


Figure26: Profils électrophorétiques de restriction enzymatique par l'enzyme EcoR1 d'une partie conservée de l'ADNr 16S.



Conclusion

Dans ce travail, nous avons procédé à un isolement et une caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulant la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine tout en suivant une démarche classique, celle appliquée par Vincent (1970 ; 1982), Somasegaran et Hoben (1994), relative à l'identification des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, à l'aspect des colonies et à l'examen microscopique nous ont permis de sélectionner 5 isolats, qui montrent les mêmes caractères du genre *Rhizobium*


L'évaluation de la tolérance de nos isolats vis-à-vis des facteurs de stress a montré que nos isolats sont capables de pousser sur une large gamme de pH allant de 5.5 jusqu'à 11. Pour la température la bonne croissance se manifeste à 28 °C. La tolérance au sel s'est révélée importante à 1% et 2%.

Les 5 isolats présentent une activité cellulolytique essentielle pour l'infection des racines en vue de la formation des nodules. Par ailleurs la majorité de ces isolats sont pourvus aussi de la nitrate réductase et de l'uréase.

Le test nutritionnel dévoile que les isolats ont tendance à utiliser une large gamme de sucres comme source de carbone. Cependant, le degré diffère d'une souche à une autre.

2 isolats sur 5 n'ont pas pu noduler les racines de la plante hôte sous des conditions bactériologiquement contrôlées en présence d'azote atmosphérique. Ce résultat négatif est probablement dû aux conditions défavorables pour la croissance de la plante.

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



Références
Bibliographiques

- Brink M, Belay GKP. 2006.** *Vignasubterranea* (L.) Verdc. Record from Protabase.
- 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: 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.
- Denarié J, Debelle F, Prome JC. 1996.** *Rhizobium* lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. **65**: 503–535.
- Duhoux E, Nicole M. 2004.** Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Eds. IRD.Montpellier. pp :1-18.
- El-Hilali I. 2006.** La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des microsymbiontes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat, Université Mohammed V-AGDAL.
- Graham PH, Sadowsky MJ, Kersters HH, Barnett 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.
- Guiraud JP. 1998.** Microbiologie alimentaire. Eds. Dunod. Paris.
- Heller R, Esnart R, Lance C. 1989.** Physiologie végétale. Eds. Masson, Paris.
- Hellriegel H, Wilfarth H. 1988.** Untersuchungen über die stickstoffnahrung der gramineen und leguminosen. Beilageheft zu der ztschr. Ver Rübenzucker – Industrie Deuten Reichs.
- Hopkins WG. 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck pp: 99-120.
- Jordan DC. 1984.** Family III. Rhizobiaceae Conn 1938 Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wikins Co. Baltimore. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). pp: 234-254.
- 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.
- 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.

- Lindström K, Lehtomäki S. 1988.** Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *rhizobium* sp. (*Galega*) compared with others fastgrowing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**: 277-287.
- 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.
- Newton WR .1998.** Nitrogénase : fonction et évolution. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13** : 238-241.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology.* **15**: 531–535.
- Palinska KA, Jahnus T, Rippka NT. 2000.** Prochlorococcus marinus strain pcc 9511,a picoplanktonic cyanobacteris synthesize the smallest uréase. *Microbiology.* **146**:3099-3107.
- Rashid, M. H., Young, J. P. W., Everall, I., Clercx, P., Willems, A., Santhosh Braun, M. and Wink, M. 2015.** Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 3037-3045
- Saskatchewan PG. 2000.** Pulse production manual. Saskatchewan Pulse.
- Struffi P, Corish V, Giacomini A, Benguedoua A, Squartini A, Casella S, Nutti MP.1998.** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Gedysarum coronarium*.*Journal of applied microbiology.* **84(1)**:81-89.
- Somasegaran P, Hoben HJ.1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.
- Stowers MD, Elkan GH. 1984.** Gluconate catabolism in Cowpea rhizobia: evidence for a Ketogluconate pathway. *Arch. Microbiol.* **137**:3-9.
- Vincent JM .1970.** The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Van Rossum DFP, Schuurmans M, Gillis A , Muyotcha HW, van Verseveld AH, Boogerd FC. 1995.** Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* **61** : 1599-1609.
- Vaneechoutte MR, Rossau P, De Vos M, Gillis D, Janssens N, Paepe A, De Rouck, Fiers T, Claeys G, Kersters K. 1992.** Rapid identification of bacteria of the *comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:227-233.

Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **51**: 89–103.

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*. **27**: 380–395.

Zhang XX, Harper R , Karsisto M , Lindström K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 104–113.



Annexes

Annexes 1

Milieux de Culture

- Yeast-Mannitol-Agar (YMA) (Vincent, 1970) en (g/l):

K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2
NaCl.....	0.1
Mannitol.....	10
Extrait de levure	0.5
Agar	15
Eau distillée	1000 ml
PH.....	6.9

Autoclavage à 120c° pendant 20min

- Yeast-Mannitol-Broth (YMB) en (g/l): Milieu YMA sans Agar

- Yeast-Mannitol-Agar + Rouge Congo en (g/l):

Après ajustement du PH on ajoute 10 ml de la solution de rouge congo (0.25g de rouge congo dans 100ml d'eau distillée) au milieu YMA

- Yeast-Mannitol-Agar + Bleu de bromothymol en (g/l):

Après ajustement du PH on ajoute 10 ml de la solution de bleu de bromothymol (0.5g de BTB dans 100ml d'eau distillée) au YMA

- Glucose peptone agar (GPA) +pourpre de bromocrésol (Vincent, 1970) en (g/l) :

Glucose.....	10
Peptone.....	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol.....	10ml
Eau distillée.....	1000ml
Agar.....	15
PH.....	6.8

Autoclavage à 120c° pendant 20 min

Solution stock de pourpre de bromocrésol(1ml BCP dans 100ml d'éthanol)

- Tryptone Yeast Agar (TY) (Beringer, 1974) en (g/l):

Tryptone.....	5
Extrait de levure.....	3
CaCl ₂ H ₂ O.....	0.87
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	6.8

Autoclavage à 120c° pendant 20 min

Annexes 2

Solution nutritive

- Solution stock des oligoéléments en g/l

H ₃ BO ₄	2.86 g
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	2.03 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	22 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0.08 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O.....	0.14 g
Le pH.....	6.8

- Solution de culture des plantes (Solution nutritive de Fahraeus, Vincent, 1970) :

CaCl ₂	0.100 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0.120 g
KH ₂ PO ₄	0.100 g
Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O.....	0.150 g
Citrate ferrique.....	0.005 g
Solutions stock des oligoéléments.....	1.0 ml
Eau distillée.....	1000ml

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C

Annexes 3

Coloration de GRAM

-Examen microscopique de la coloration de Gram :

On prépare des lames pour la coloration. La préparation est étalée en couche mince sous la hotte, le protocole expérimental consiste à :

- recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- rincer avec l'eau
- verser sur la lame le lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- rincer avec l'eau
- incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone pendant 15sec.
- laver à l'eau distillée immédiatement.
- recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute.
- laver à l'eau distillée.
- observer au microscope.

Annexe 4

- 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

Année universitaire: 2015/2016

Présenté par: Khallef Lina Rayene
Bendana Rahil Imene

Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la lentille (*lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine.

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

Résumé :

Dans cette étude cinq bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara Constantine. L'étude morphologique et culturale classe ces isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium*. Les tests biochimiques évaluent la présence d'une activité de différentes enzymes chez tous les isolats telles que : la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase. Les résultats ont montré que ces isolats assimilent préférentiellement les disaccharides et les sucres alcool. La caractérisation phénotypique par les tests de tolérance aux stress abiotiques (salinité, pH et température) a mis en évidence une limite de tolérance des isolats respectivement de 11 pour le pH, 5% pour le NaCl et une température optimale à 28°C. La caractérisation symbiotique a révélé la formation de nodule chez 3 isolats sur 5. Enfin d'après la caractérisation génotypique PCR/RFLP aucune discrimination n'a été révélée entre les 5 isolats.

Mots clés: *Rhizobium*, *Lens culinaris*, nodules racinaires, caractérisation phénotypique et génotypique

Laboratoire de recherche: Laboratoire des biotechnologies, Faculté des sciences de la nature, Université Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury:	Mme. I. Guergouri	M.C- UFM Constantine
Rapporteur:	Mme. N. Riah	M.C- UFM Constantine
Examineurs:	Mme. A. Hecini	M.C- UNI3 Constantine

Date de soutenance: 12/06/2016