



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم
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

قسنطينة
كلية الطبيعة الحياة

Département : Biologie Animale

: بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

**Détermination de la variabilité de l'effet de nodulation de la légumineuse
Phaseolus vulgaris et *Phaseolus coccineus* par différentes souches
rhizobiales**

Présenté et soutenu par : Zouilekh Zahira
Ouadi Rayane

Le : 21/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Gharzouli Razika (Maitre de conférence classe B - UFM Constantine),

Rapporteur : Saoudi Mouna (Maitre assistante classe A - UFM Constantine),

Examineurs : Bechkri Sara (Maitre assistante classe A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Résumé

Abstract

Introduction.....01

Chapitre 1: Revu bibliographique

I-la symbiose fixatrice d'azote *Rhizobium*/ légumineuses.....03

I-1-La fixation biologique de l'azote.....03

I-2- Le couple *Rhizobium*-légumineuse.....04

I-2-1- Le partenaire bactérienne : *Rhizobium*.....04

I-2-2- Le partenaire végétal : la légumineuse.....06

II- Génétique de fixation et les différentes étapes de formation de nodosité.....09

II-1-Pré 'échange de signal de l'infection.....09

II-2-L'infection.....10

II-3-L'organogenèse du nodule.....11

Chapitre II : Matériel et méthodes

I-Isolement des bactéries et étude phénotypique des isolats.....14

1-1-Isolement des bactéries à partir des nodules.....14

I-2-Etudes des caractères morphologiques des isolats.....16

I-2-1-Examen microscopique.....16

1- 2-2-Examen macroscopique des isolats.....16

II-Recherche d'enzymes spécifiques à la nodulation.....17

II-1- Réduction des nitrates.....17

II-2- Hydrolyse de l'urée.....17

II-3-Activité cellulosique.....18

II-4- Activité pectinolytique.....	18
III-la prestation symbiotique avec la plante (test de nodulation).....	18
III-1-La croissance bactérienne.....	18
III-2- Stérilisation des graines.....	19
III-3- Inoculation des jarres.....	20

Chapitre III: Résultat et discussion

I-Etudes des caractères morphologiques des isolats.....	23
I-1-Examen microscopique.....	23
1-2- Examen macroscopique des isolats.....	23
II-Recherche d'enzymes spécifiques à la nodulation.....	24
II-1-Réduction des nitrates.....	24
II-2-Hydrolyse de l'urée.....	25
II-3-Activité cellulosique.....	26
II-4-Activité pectinasique.....	26
II-La prestation symbiotique avec la plante hôte (test de nodulation).....	27
II-1- Mesure de la croissance bactérienne.....	27
II-2-Test de nodulation.....	30

Conclusion	32
------------------	----

Référence biobibliographique.....	34
-----------------------------------	----

Annexes

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	page
01	Classification des rhizobia selon Berrada et Benbrahim (2014)	04
02	Isolats et des souches de référence utilisée pour cette étude	15
03	Mesure de la Croissance bactérienne(D.O ₆₀₀) de la souche témoin 1 - <i>Mezorhisobium ciceri</i>	44
04	Mesure de la Croissance bactérienne(D.O ₆₀₀) de la souche témoin 1 - <i>Rhizobium sllae</i> -	44
05	Mesure de la Croissance bactérienne(D.O ₆₀₀) de l'isolat S ₁₀	44
06	Mesure de la Croissance bactérienne(D.O ₆₀₀) de l'isolat m ₂	44
07	Mesure de la Croissance bactérienne(D.O ₆₀₀) de l'isolat T ₁	44
08	Mesure de la Croissance bactérienne(D.O ₆₀₀) de l'isolat b ₁	44

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	<i>Phaseolus coccineus</i> et leur graines (Anonyme, 2009)	08
02	<i>Phaseolus vulgaris</i> et leur graines (Anonyme, 2009)	08
03	Dialogue moléculaire initiant la symbiose <i>Rhizobium</i> –légumineuses (Oldroyd, 2001, Hassan; Mathesius, 2012)	10
04	Etapes de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par rhizobia (Madigan et Martinko, 2007)	12
05	Conservation des nodules (Vincent, 1970).	
06	Flacons contiennent du TY	19
07	(A) : flacon remplis des graines de <i>P.coccineus</i> dans l'eau distillée stérile (B) : flacon remplis des graines de <i>P.vulgaris</i> dans l'eau distillée stérile (C) : boîte de Pétri contient des graines stériles après leur scarrification Mécanique	19
08	Flacon contient la solution nutritive	20
09	Flacon après leur inoculation	21
10	Observation microscopique des coccobacilles a Gram négatif (isolat S ₂) sous microscope optique(x100)	23
11	L'aspect des colonies : (A): sur YMA (isolat Z ₂) (B): sur YMA+rouge Congo (isolat S ₂)	23
12	Test de la vitesse de croissance :(A): avant incubation (Isolat T ₂) (B) : après 24h d'incubation	24
13	Test de nitrate réductase (résultat positive d'isolat m ₂)	25
14	Test de l'urease : (A): Boite témoin (B): Résultats positive d'isolat T ₂	25
15	Test de pictinase :(A) : Résultats positif (isolat z ₂) (B): Résultats négatif (isolat m ₂)	26
16	Test de pictinase(résultats positif d'isolat z ₂)	26
17	Courbe de croissance bactérienne de la souche Témoin - <i>Mezorhizobium ciceri</i> -	27
18	Courbe de croissance bactérienne de la souche témoin - <i>Rhizobium sullae</i> -	27

19	Courbe de croissance bactérienne de la souche S ₂	28
20	Courbe de croissance bactérienne de la souche m2	28
21	Courbe de croissance bactérienne de la souche T ₁	29
22	Courbe de croissance bactérienne de la souche B ₁	29
23	Figure 23: (A):représentation des nodules chez la plante qu'il est inoculé avec la souche - <i>Mesorhizobium ciceri</i> - (B):représentation des nodules chez la plante qu'il est inoculé avec l'isolat B ₁ (C) : représentation des nodules chez la plante qu'il est inoculé avec l'isolat S ₂	30

Remerciement

Nous remercions tout d'abord

le bon Dieu,

le tout puissant de nous avoir

donné la chance,

la volent et la patience,

le courage

pour réaliser ce modeste

travail.

Remerciement

*Nous tenons à remercier infiniment et très sincèrement **Mme Saoudi M.**, maître assistante classe A de l'université des Frères Mentouri Constantine pour la confiance qu'elle nous a fait et d'avoir accepté de diriger ce travail, et d'être disponible et patiente tout au long période de notre étude.*

*Nous tenons à remercier aussi **Mm Gharzouli R**, Maitre de conférences classe B de l'université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir fait l'honneur d'être président du jury.*

***Mm Bechkri S**, Maitre assistante classe A de l'université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous aimerons remercier également toute l'équipe de laboratoire de biotechnologie **Radja, Hanane, leila, Marwa** pour leurs conseils et aides et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire, et à tous ceux qui ont participé à l'aboutissement de ce travail.*

Dédicaces

*Merci mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, La force d'y croire, la
patience jusqu'au bout du rêve*

Et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire'' Ya الله''

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, Le symbole de tendresse, qui s'est
sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,*

A ma mère et mon père

A mes frères : Bourhane El-Dine, El-moundir Imad El-dine

Et mes sœurs:Nawel, Souad et Meriame

A mes chers grands mère, A mon grand père et toute ma famille sans exception

A mon bras droit, mon binôme. rayane qui m'a apporté :

La force, la patience,l' amitié

A tous ceux qui me sont chers, A tous ceux qui m'aiment,

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Zahira

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédie le modeste travail à

Mes cher parentes, la source de ma tendresse, de mon bonheur, mon courage pour réussir tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour que je porte, que dieu vous protègent et vous gardent pour nous

*A mes chères sœurs **Aya, Hawa** et à mon frère **Fatah***

A tous les membres de ma famille, petits et grands

*A mes adorables amies qui sont proche de mon coeur
Meriem, Asma, Radia, Rania, Dallel, Amani, Rayane, Sandra,
Nardjess, Lina, Fatiha, wissel, Yasmin*

*Merci a mon binôme **Zahra** pour tout le beau moment que nous avons partagé*

A tous mes collègues de promotion

A tous ce membre de laboratoire

*A tous les personnes qui ont été toujours prés de moi,
Pour vos nombreux encouragements et vos conseils*

Rayane

Résumé

Parmi de nombreuses légumineuses, nous sommes intéressés au cours de ce travail à étudier la biodiversité des bactéries nodulant les deux espèces du genre *Phaseolus*, (*P.vulgaris* et *P.coccineus*), ce dernier a une importance dans l'alimentation humaine vu sa richesse nutritionnelle.

Nous avons effectuées un isolement et purification de 10 souches à partir des nodosités prélevés de différentes régions de l'Est de notre payé.

La caractérisation des isolats porte sur une étude morphologique et culturelle suivie d'une caractérisation phénotypiques qui basées sur la recherche d'enzymes spécifiques au processus de nodulation (le nitrate réductase, l'uréase, le cellulase et le pectinase) en présence de souches témoins, Cette étude montre que toute les souches présentent des caractères phénotypiques comparables aux *Rhizobium*.

Un test de nodulation est effectuée en mettant en évidence l'aptitude des isolats et les souches de références à noduler les racines de la plante hôte qui a montré après Cinq semaines d'inoculation, l'apparition des nodules au niveaux des racines secondaires des deux légumineuses(*P.vulgaris* et *P.coccineus*) les nodules ainsi induits montrent une hétérogénéité dans la taille.

Mots clés : *Phaseolus*, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, nodulation, *Rhizobium*, symbiose

Abstract

Among many leguminous plants, we have been interested throughout this work in studying the biodiversity of the bacteria nodulant the two species of the *Phaseolus* kind, (*P.vulgaris* and *P.coccineus*), this last has an importance in the human consumption considering its nutritional richness.

We made an isolation and purification of 10 strains from nodosities taken of different region of the East of our country.

The characterization of the isolates relates to a study morphological and farming followed of a characterization phenotypical which based on the search for enzymes specific to the process of nodulation (the nitrate réductase, urease, the cellulase and the pectinase) in the presence of the control strain strains, this study shows that all the strains present phenotypical characters comparable with *Rhizobium*.

Nodulation test is performed by highlighting the ability of the isolates and the strains of references to nodulate the roots of the plant host which showed after five weeks of inoculation, the appearance of the nodules on the level of the secondary root of the two leguminous plants (*P.vulgaris* and *P.coccineus*) the nodules thus induced show a heterogeneity in the size.

Keywords: *Phaseolus*, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, nodulation, symbiosis, *Rhizobium*.

بين العديد من الباقوليات نحن نهتم في هذا العمل بدراسة التنوع البيولوجي لبكتيريا معزولة من عقد جذرية لكلا من جنس *Phaseolus* نوعي *P. vulgaris* و *P. coccineus* والتي لها أهمية في النظام الغذائي للإنسان نظرا لثروتها الغذائية حيث أجرينا تنقية وعزل 10 سلالات من العقيدات التي تم جمعها من مناطق مختلفة من شرق بلدنا.

الدراسة الوصفية للعزلات تعتمد على مجموعة دراسة مرفولوجية متنوعة بخصائص وصفية مظهرية للبحث عن أنزيمات خاصة لعملية التكوين العقدي (اختزال النترات ، اليورياز ، و السيلولوز و بكتيناز) بوجود سلالات شاهدة. تبين هذه الدراسة أن جميع السلالات لها نفس الصفات المظهرية المشابهة ل *Rhizobium* .

تم إجراء الاختبار التعايشي و ذلك من خلال تسليط الضوء على قدرة العزلات بتشكيل قدرة جذرية لنبات حيث ظهرت بعد خمسة أسابيع من التلقيح، عقد جذرية على مستوى الجذور الثانوية لكلا نوعي لفاصوليا وقد أظهرت العقيدات الناجمة عن عدم التجانس في الحجم.

الكلمات المفتاحية : *Phaseolus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus*. التكوين العقدي, *Rhizobium*, التعايش



Introduction

Introduction

La symbiose *rhizobium* légumineuse est un processus indispensable non seulement à la plante (premier partenaire) pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobia (deuxième partenaire) pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement.

L'association symbiotique *rhizobium* -légumineuse présente un haut niveau de spécificité sur une communication moléculaire entre deux partenaires. Cette relation se manifeste par la formation des structures racinaires, les nodules qui sont le siège de la fixation d'azote atmosphérique.

Le genre *Phaseolus* ou l'haricot, appartenant à la famille des fabacées, sous famille des *Papilionoideae*, est une légumineuse très répandue dans le monde à cause de ces valeurs nutritionnelle et son grand intérêt économique. Les espèces du genre *Phaseolus* sont largement distribuées dans le monde entier et, en plus cultivées dans les régions tropicales, également développé dans les zones tempérées du Nord et du Sud (Martin Brink, Getachew Melese Belay - 2006).

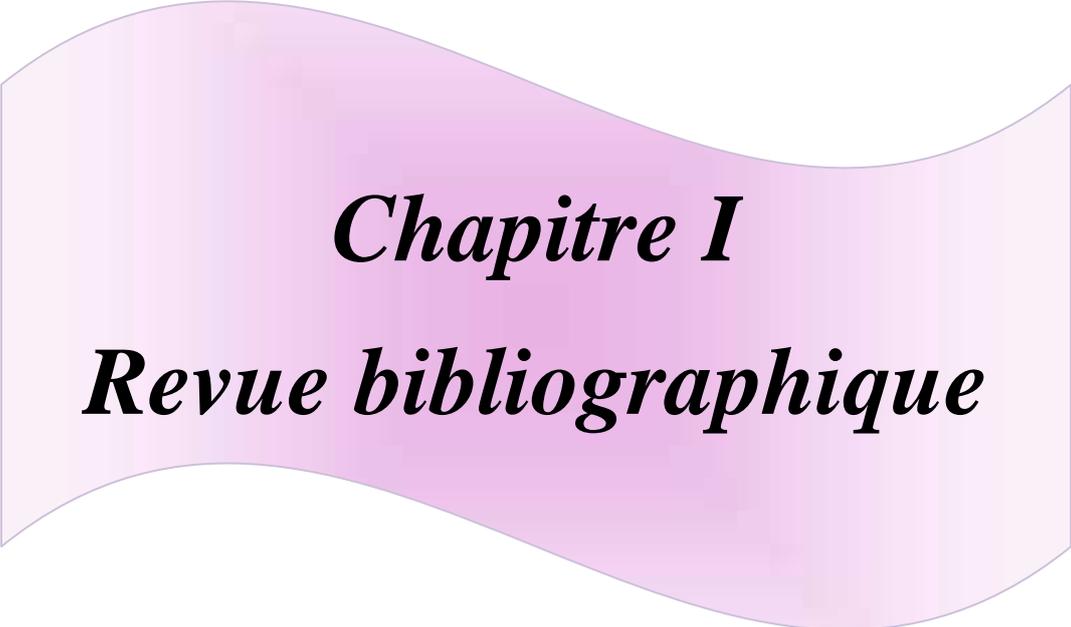
La présente étude a été réalisée au laboratoire de biotechnologie, université des Frères Mentouri de Constantine. Elle porte en priorité sur l'évaluation et l'étude des bactéries symbiotiques nodulant les espèces de genre *Phaseolus* (particulièrement les deux espèces *P. vulgaris* et *P. coccineus*) cultivées en Algérie dans différents étages climatique.

Dans l'objectif d'évaluer la spécificité de la relation symbiotique existant entre les deux partenaires, les isolats sont caractérisés phénotypiquement : test morfo-cultureux, tests enzymatiques et par une prestation symbiotique entre isolats et plante hôte.

Donc notre travail est structuré de la manière indiquée ci-dessous :

- Revue Bibliographie est consacré sur la symbiose fixatrice d'azote légumineuse –*Rhizobium*
- La partie Matériel et Méthodes adopté à l'expérimentation en laboratoire.
- Les Résultats et Discussion obtenus de cette présente étude.

En fin le travail sera achevé par une conclusion générale.



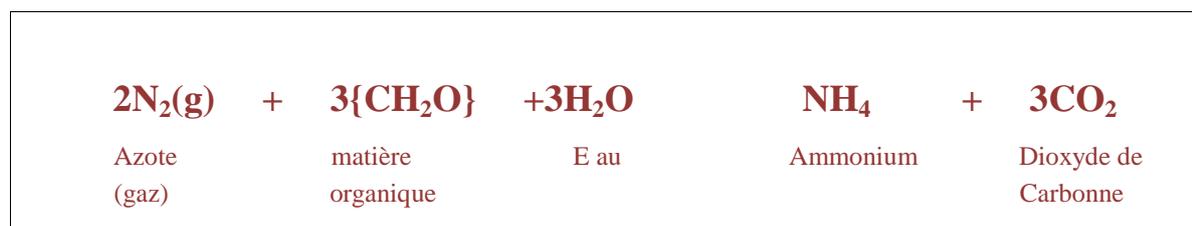
Chapitre I
Revue bibliographique

I-La symbiose fixatrice d'azote légumineuse /*Rhizobium*

I-1-La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Les organismes assimilateurs de N₂ sont des eubactéries et archaebactéries procaryotes réparties dans plus de 100 genres; certains fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose (Pelmont, 2005): c'est le processus qui permet aux végétaux de fixer l'azote atmosphérique par le biais d'une relation symbiotique principalement entre les bactéries du genre *Rhizobium* associés aux plantes de la famille *Fabacées*. (Pousset, 2002).

Dans cette association symbiotique, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. Chez les légumineuses, les rhizobia s'installent dans les racines des plantes; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie; celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Pousset, 2003). La réaction chimique type est



L'interaction symbiotique se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodoisités, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret et al., 2000 ; Gibson et al., 2008). L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires

I-2- Le couple *Rhizobium*-Légumineuse

I-2-1- Le partenaire bactérien : *Rhizobium*

a - Généralités

Le terme *Rhizobium* est attribuée aux bactéries telluriques a été utilisé pour désigne ces bactéries formant des nodules sur les légumineuses du grec, « *Rhizo*» = racine et *bium*= vivant. Dénommé ainsi par Franck car ce microorganisme vit dans les racines (Franck, 1889).

Les *Rhizobium* sont des bactéries à Gram négatifs, strictement aérobie non sporulant, et généralement mobile grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles (Jordan, 1984 et Werner, 1992) ces bactéries peuvent exister sous deux formes: la forme végétative que l'on trouve dans le sol et la forme bactériode que l'on rencontre à l'intérieur des cellules de cortex racinaire (werner, 1992).

Le génome au *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un méga-plasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieur à 1 Mb, selon les espèces (Laranjo et al., 2002). L'existence de séquences répétitives d'ADN est une caractéristique du génome de *Rhizobium*.

b- Classification des *Rhizobium*

La classification des *Rhizobium* a été passée par un changement substantiel au cours des dernières années grâce à l'ajout de plusieurs nouveaux genres et espèces de ce groupe de bactéries importantes. Des études récentes ont montré l'existence d'une grande diversité parmi les bactéries fixatrices d'azote isolées à partir de différentes légumineuse (tableau 1).

Tableau1 : Classification des *Rhizobia* selon Berrada et Benbrahim (2014)

	Source d'isolement	Référence
Classe: <i>Alphanroteobacteria</i> Ordere: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i> Genre: <i>Rhizobium</i> <i>R. leguminosarum</i> <i>Symbiovarviciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Viciae</i> , <i>Lens</i> , <i>Lathyrus</i>	Frank et al., 1889 Frank et al., 1889; Jordan et al., 1982 Jordan et al., 1982; Renan et al., 2012
<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank et al., 1889; Jordan et al., 1982
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>	Terefework et al., 1998; Lindstrom et al., 1989 Lindstrom et al., 1989
<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i> , <i>Leucaena</i>	Martinez et al., 1991
<i>Symbiovar officinalis</i> <i>Symbiovar orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i>	Renan et al., 2012 Martinez et al., 1991 Lopez et al., 2010

<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>	Tian et al., 2008 Segovia et al., 1993
<i>R. leucaenae</i>		
<i>R. tropici</i>		Wang et al., 1999
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Souza et al., 1994
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	de Lajudie et al., 1998
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus.</i>	
<i>Symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	
<i>Symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Chen et al., 1988
<i>Symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Wang et al., 1998
<i>Symbiovar gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Van et al., 1998
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tan et al., 2001
<i>Symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	Bouzar et al., 2001
<i>Symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Wei et al., 2002
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum. Centrosema</i>	Squartini et al., 2002
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wei et al., 2003
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>	Garcia et al., 2007
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>	Gu et al., 2008
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus beniamina</i>	Han et al., 2008
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>	Peng et al., 2008
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>	Ramirez et al., 2008
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus. Lespedeza</i>	Lin et al., 2008
<i>R. cellululosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>	Berge et al., 2009
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	Lu et al., 2009
<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>	Hou et al., 2009
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	El Akhal et al., 2008
<i>R. nisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Hou et al., 2009
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>	Young et al., 2001
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	
<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>	Pulawska et al., 2012
<i>A. oxalatiphilum</i>		
Genre: <i>Devosia</i>		
<i>Devosianeptunia</i>		
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i>		
Genre: <i>Bradyrhizobium</i>		
<i>B. japonicum</i>		Xu et al 1995
<i>B. elkanii</i>		Yao et al., 2002
<i>B. liaoningense</i>		Rivas et al., 2004
<i>B. yuanmingense</i>		Vinuesa et al., 2005
<i>B. betae</i>		Islam et al., 2008
<i>B. canariense</i>		Ramirez et al., 2009
<i>B. iriomotense</i>		Islam et al., 2008
<i>B. iicamae</i>		
<i>B. lablabi</i>		Islam et al., 2008
<i>B. huanghuaihaiense</i>		
<i>B. cytisi</i>		Zhang et al., 2012
<i>B. daainense</i>		
<i>B. denitrificans</i>		Chahbourne et al., 2011
<i>B. oligotrophicum</i>		Wang et al., 2013
<i>B. pachyrrhizi</i>		
Classe: <i>Beta Proteobacteria</i>		Van et al., 2006
Ordere: <i>Burkholderiales</i>		
Famille: <i>Burkholderiaceae</i>		
Genre: <i>Burkholderia</i>		
<i>B. caribensis</i>		
<i>B. cepacia</i>		Ramirez et al., 2013
<i>B. tuberum</i>		Van. Eardly 2002
<i>B. phymatum</i>		Achouak et al., 1999
<i>B. nodosa</i>		Moulin et al., 2001
<i>B. sabiae</i>		Vandamme et al., 2003
<i>B. mimosarum</i>		Chen et al., 2007
<i>B. rhizoxinica</i>		Chen et al., 2008
<i>B. diazotrophica</i>		Chen et al., 2003
<i>B. endofungorum</i>		Partida et al., 2007
<i>B. heleia</i>		Sheu et al., 2013
<i>B. symbiotica</i>		Partida et al., 2007
Genre: <i>Cupriavidus</i>		Aizawa et al., 2010
	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>Phaseolus</i>	
	<i>Vicia faba</i>	
	<i>Phaseolus.</i>	
	<i>Mimosa affinis</i>	
	<i>Phaseolus</i>	
	<i>Neptunia natans</i>	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>Phaseolus</i>	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>Desmodium sinuatum. Centrosema</i>	
	<i>Sesbania herbacea</i>	
	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>	
	<i>Amphicarpaea</i>	
	<i>Ficus beniamina</i>	
	<i>Indigofera spp.</i>	
	<i>Hedysarum</i>	
	<i>Astragalus. Lespedeza</i>	
	<i>Populus alba</i>	
	<i>Lespedeza</i>	
	<i>Multiple legume species</i>	
	<i>Oryza alta</i>	
	<i>Pisum sativum</i>	
	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<i>Caragana intermedia</i>	
	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	
	<i>Oxytropis glabra</i>	
	<i>Coastal dune plant</i>	
	<i>Neptunia natans</i>	
	<i>Glycine max. Glycine soja</i>	
	<i>Glycine max</i>	
	<i>Glycine max</i>	
	<i>Glycine max</i>	
	<i>Lespedeza</i>	
	<i>Betae vulgaris</i>	
	<i>Genisteae et Loteae</i>	
	<i>Entada koschunensis</i>	
	<i>Pachyrhizus erosus</i>	
	<i>Lablab purpureus</i>	
	<i>Glycine max</i>	
	<i>Cytisus villosus</i>	
	<i>Glycine max</i>	
	<i>Aeschynomene</i>	
	<i>Pachyrhizus erosus</i>	
	<i>Vertisol microaggregates</i>	
	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	
	<i>Aspalatus carnosa</i>	
	<i>Machaerium lunatum</i>	
	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa</i>	
	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	
	<i>Mimosa spp.</i>	
	<i>Rhizopus microsporus</i>	
	<i>Mimosa spp.</i>	
	<i>Rhizopus microsporus</i>	
	<i>Eleocharis dulcis</i>	
	<i>Mimosa spp.</i>	
	<i>Aspalatus carnosa</i>	

<i>C. taiwanensis</i> Classe: <i>Gamma-Proteobacter</i> Ordre: <i>Pseudomonadales</i> Famille: <i>Pseudomonaceae</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Mimosa sp.</i> <i>Robinia pseudoacacia</i>	SHEU et al., 2012 Vandamme, Coevene, 2004 Shiraishiet al., 2010
---	--	---

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

I-2-2- Le partenaire végétal : La légumineuse

a- Généralités

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne,...) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène).

La famille des légumineuses ou Fabacées est la troisième des plus grandes familles de plantes à fleurs (après les orchidées et les astéracées), avec environ 650 genres et près de 20 000 espèces (Gepts et al., 2005), Ces espèces sont réparties en trois sous-familles: Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow, 2003),Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven et al., 2000).

-Les Caesalpinioideae : ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd et al., 2001).

-Les Mimosoideae : Ce 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 (Judd et al., 2001).

-Les *Papilionoideae* : Dans cette sous-famille dont le genre *Phaseolus* fait partie, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées. La majorité des espèces sont herbacées; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales: un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judy et al., 2001).

b- Le *Phaseolus*

Le genre *Phaseolus* se classe dans la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* sous-famille *Papilionoideae* et ordre des *Fabales*. Au sein des *Phaseolinae* (à stylet barbu sous le stigmaté), les deux genres *Phaseolus* et *Vigna* sont les plus

importants et contiennent à eux seuls le plus grand nombre d'espèces cultivées comme légumineuses vivrières. La section *Phaseolus* du genre *Phaseolus* est la plus importante et regroupe notamment les cinq espèces cultivées : *P. acutifolius* A. Gray., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* Greenm. et *P. vulgaris* L. Comme pour la plupart des espèces du genre, le génome du *phaseolus* comprend 11 paires de chromosomes ($2n=22$). (Maréchal *et al.*, 1978 ; Baudoin *et al.*, 2002 ; Freytag et Debouck, 2002. Gepts *et al.*, 2008).

- *Phaseolus coccineus* (L' haricot d'Espagne)

L'origine : L'haricot de l'Espagne est présent à l'état sauvage de Mexique à Panama, il a probablement été domestiqué au Mexique. L'haricot d'Espagne est cultivé dans les pays tempérés et parfois dans les régions de hautes terres d'Amérique centrale et du sud d'Afrique (Martin Brink, Getachew Melese Belay - 2006)

Description morphologique : Le haricot d'Espagne est une plante herbacée vivace à rames. C'est une légume oublié, appréciée pour ses fleurs rouge écarlate ou blanches en bouquets s'épanouissant en été et pour leurs graines comestibles.

L'espèce *Phaseolus coccineus* fixe l'azote atmosphérique par la symbiose avec des bactéries *Rhizobium* à croissance rapide. A la différence des autres espèces du genre *Phaseolus*, c'est une plante par sa racine pivotante tubérisée mais uniquement en climat chaud. C'est pour cette raison qu'elle est habituellement cultivée comme plante annuelle). Les graines de l'haricot d'Espagne germent au bout de 10-14 jours après le semis, la floraison débute 40-60 jours après le semis ces fleurs s'ouvrent au lever du soleil et se fanent au moment où il se couche.

(Martin Brink, Getachew Melese Belay - 2006) (Figure1).



Figure 1: La plante *phaseolus coccineus* et leur graines (Anonyme ,2009)

- *Phaseolus vulgaris* (L'haricot commun) :

L'origine : est de l'Amérique latine et centrale, l'haricot commun sous le nom scientifique de *Phaseolus vulgaris* parmi les légumineuses qui ont été domestiquées depuis

plus de 8000 ans (Gepts et Debouck, 1991) et occupe une place importante dans le système agricole de presque tous les pays tropicaux (Kplan, 1981, Gepts, 1990). L'haricote était cultivé par les tribus indiennes du Mexique ainsi qu' au Pérou.

Description morphologique : L'haricot de *Phaseolus vulgaris* est une plante herbacée avec un port qui peut changer d'une variété à une autre. deux grands groupes sont distingués les variétés à tige volubile qui peut atteindre 3m de hauteur ces variétés ont besoin de support pour soutenir la tige, et les variétés naines à tige ramifiée de 40 à 60 cm de hauteur (Guignard, 1998).

L'espèce *P. vulgaris* est une plante annuelle à végétation rapide son cycle est de 90 à 120 jours (Peron, 2006). Le système racinaire est profond et peut descendre jusqu' à 1.20m, après 15 à 20 jours des semis, des nodules peuvent se former sur ces racinelles (Adams et *al.*, 1985).



Figure 2: *Phaseolus vulgaris* et leur graines (Anonyme ,2009)

II- Génétique de fixation et les différentes étapes de formation de nodosité

La nodulation est considérée comme la première caractéristique à l'association symbiotique est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo et al., 2008 ; Lohar et al., 2009).

La formation des nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante (Michelle et Lindeque, 2006)'. L'analyse génétique de diverse espèce de *Rhizobium* a permis d'identifier trois types de gènes symbiotiques qui entre le dialogue moléculaire plante / *Rhizobium* ;

- Les gènes *nod* contrôlent la reconnaissance spécifique, l'infection et la nodulation.
- Les gènes *fix* indispensable pour la fixation d'azote.
- les gènes *nif* codent pour le complexe de nitrogénase.

L'expression régulière de ces gènes nous permettons d'établir les étapes de nodulation :

II-1-Pré'échange de signal de l'infection

La bactérie et la plante hôte mettent en place un système de dialogue basé sur un échange de molécules chimique. Dans un premier temps, les racines excrètent des flavonoïdes (molécules signales) en conditions de carence en ions ammonium (Patriarca et al., 2004). ce signale une fois perçu par le *Rhizobium*, Il est reconnu spécifiquement par des protéines régulatrice bactérienne, les protéines *nod D*. avec la coopération des flavonoïdes, les protéines *nodD* vont pouvoir mouvoir l'expression coordonnées des gènes de nodulation (gène *nod*). par l'intermédiaire de boîte régulatrice (*nod Box*) lieu de régulation des gènes *nod A*, *B* et *C*. Les gènes *nod* sont organisés en opérons et produisent des enzymes qui contrôlent la synthèse de molécule indispensable au processus de nodulation, ces signaux généralement connu sous le nom de facteurs *nod* sont des molécules Lipo-chito-oligosaccharidiqu(Tereferwork,2002) ils sont constitués d'un squelette de trois à six résidus N-acétyl-D-glucosamine réunie par de liaisons B(1-4) (Figure 3).

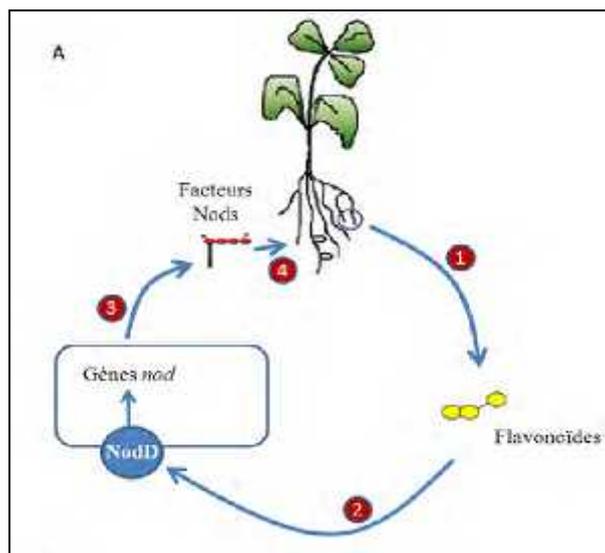


Figure 3: Dialogue moléculaire initiant la symbiose *Rhizobium* –légumineuses.

(A) (1) Les racines de la plante hôte sécrètent des flavonoïdes. (2) Les flavonoïdes sont perçus par les rhizobies, activant la protéine *nodD* responsable de la régulation positive de l'expression des gènes *nod* bactériens. (3) Les rhizobies sécrètent en retour des facteurs Nods. (4) Les facteurs Nods sont perçus par la plante au niveau des poils absorbants racinaires et activent l'initiation du programme symbiotique (Oldroyd, 2001, Hassan; Mathesius, 2012).

II-2- L'infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de, la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques, les lectines localisées à la surface des cellules (Krishnan et Bennett, 2007). Les facteurs *nod* émis par les rhizobies, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de Ca^{2+} . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques, les gènes A, B et C sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces rhizobiales et leur mutation provoquent une perte complète de la capacité à noduler les plantes hôtes. En effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation, la modification de la croissance polaire des poils absorbants en formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les rhizobies (Esseling et al., 2003; Pelmont, 1995; Gage, 2004). L'infection qui s'accompagne d'une digestion de la paroi cellulaire du poil racinaire peut avoir lieu à travers les poils absorbants, les blessures, ou l'espace intracellulaire (Rasanen, 2002).

II-3- L'organogenèse du nodule

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe c'est le filament d'infection (Dupuy et Nougier, 2005). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (Bélanger, 1998). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit presque la totalité de la racine, la zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (Dupuy et Nougier, 2005).

La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des *Rhizobiums* à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des *Rhizobiums* en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes. Au sein de bactéroïde grâce à un complexe enzymatique qui permet la fixation de l'azote, ces derniers fournissent la machinerie génétique pour la synthèse de nitrogénase : ce sont les gènes *nif* et *fix*. Les gènes *fix* plus qu'ils sont des gènes essentiels à la fixation d'azote, ils sont nécessaire aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer d'azote et ne sont présente que chez les fixatrice symbiotique (Broughton, 2000).

Les gènes *nif* codent pour la biosynthèse de complexe nitrogénase qui est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Il est constitué de deux métalloprotéines : le site de la réduction du substrat est la protéine MoFe (composant I ou dinitrogénase) et le donneur d'électrons est la protéine Fe (composant II ou dinitrogénase réductase).

Le composant I est un hétérotétramère de type 2×2 codé par les gènes *nifD* et *nifK* et le composant II est un homodimère codé par le gène *nifH* (Howard et Rees, 2000).

La nitrogénase est un complexe enzymatique très sensible à l'oxygène, qui est rapidement inactivé dans un environnement aérobie. La nodosité lui confère une niche protectrice grâce à la présence d'une protéine végétale, la leghémoglobine qui fixe l'oxygène et permet de le maintenir à faible pression partielle. Elle se lie à l'oxygène et permet ainsi de réguler la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes (Ott et *al.*, 2005).

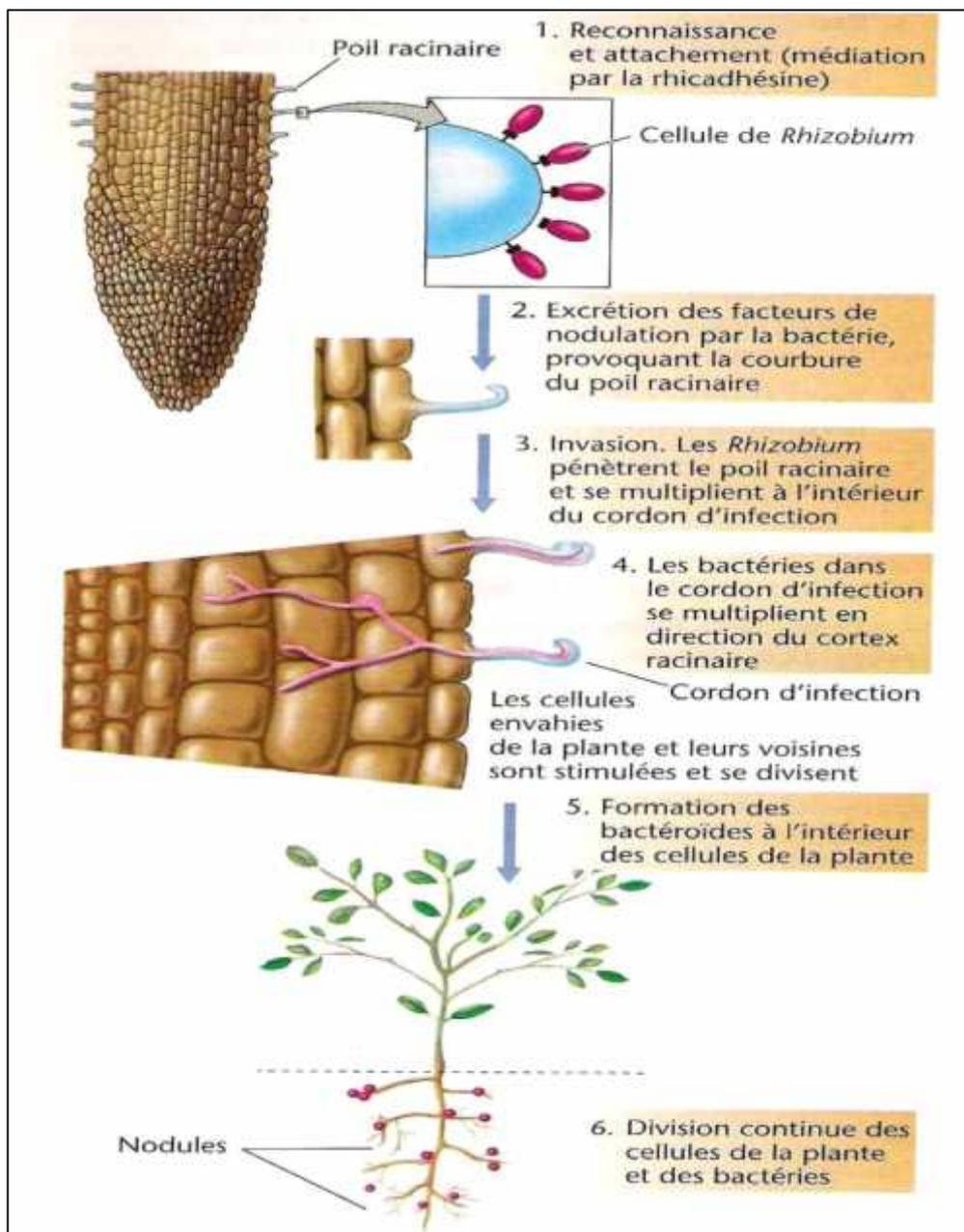


Figure 4: Etapes de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par les *rhizobia* (Madigan et Martinko, 2007).



Chapitre II
Matériels et méthodes

I-Isolement des bactéries et étude phénotypique des isolats

a) La collecte des nodules

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent, J.M. (1970) et Somasegaran, P. et J. Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet

b) Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le chlorure de Calcium (CaCl_2) (Vincent, J.M., 1970) et la stérilisation des nodosités (Figure 5)

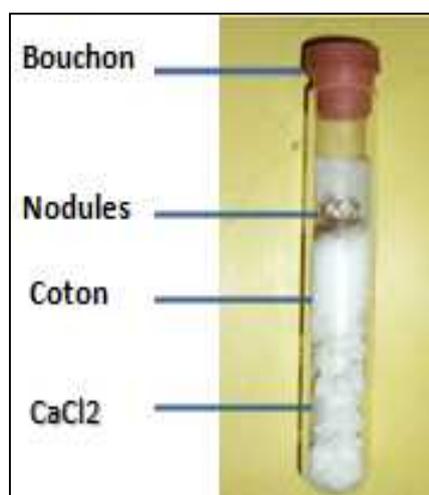


Figure 5: Conservation des nodules (Vincent, 1970)

c) Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau au réfrigérateur toute une nuit. Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol absolu puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié à 0.1% (p/v) pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent, J.M.,1970).

d) Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, J.M. (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri

stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA, Vincent, J.M., 1970) additionné de rouge Congo (Annexes 1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser.

Tableau 2: isolats et des souches de référence utilisée pour cette étude

	Souches	Plante- hôte	Origine géographique	Source
A	<i>Rhizobium sllae A6</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine
Mez	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S. Dekkiche- Cne
T ₁	Notre etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda(Tammalous), Algérie	Cette etude
T ₂	Notre etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda(Tammalous), Algérie	Cette étude
S ₁	Notre etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma (Salah Salah Salah), Algérie	Cette étude
S ₂	Notre etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma (Salah Salah Salah), Algérie	Cette étude
m ₁	Notre etude	<i>Phaseolus Coccineus</i>	Guelma (Mdjez Ammar), Algérie	Cette étude
m ₂	Notre etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma (Mdjez Ammar), Algérie	Cette étude
B ₁	Notre etude	<i>Phaseolus Vulgaris</i>	El kol(benzouit), Algérie	Cette étude
b ₂	Notre etude	<i>Phaseolus Vulgaris</i>	Skikda(Benzouit), Algérie	Cette étude
z ₁	Notre etude	<i>Phaseolus Vulgaris</i>	Annaba (Boumaaza), Algérie	Cette étude
z ₂	Notre etude	<i>Phaseolus Vulgaris</i>	Annaba (Boumaaza), Algérie	Cette étude

Les bactéries isolées sont conservées sur milieu YMA (annexe 01) tamponné au CaCO₃ à 4°C.

I-2-Etudes des caractères morphologiques des isolats

I-2-1-Examen microscopique :

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois Hans Christiane Gram qui mit au point le protocole en 1884. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer : les bactéries dites Gram positif et bactéries dites Gram négatif.

a) Etapes de la coloration des frottis

A partir des cultures fraîches en milieu YMB(Annexe 01) de chaque souche, la préparation est étalée sur des lames en couche mince diluée dans une goutte d'eau distillée stérile, séchée et fixée par la chaleur du bec bunsen sous la hotte .Puis colorer selon les étapes suivantes :

- recouvrir la lame par un colorant basique le violet de Gentiane, laisser agir pendant 1min.
- Chasser le violet avec le Lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau.
- Recouvrir la préparation par la Fuchsine, laisser agir durant 1 min.
- Un nouveau lavage à l'eau, puis on égoutte la lame sur du papier absorbant puis observer à l'objectif 100 en mettant une goutte d'huile à immersion.

1 2-2 Examen macroscopique des isolats

a) La croissance des isolats sur le YMA

Le Yeast Mannitol Agar (YMA) et le YMA + rouge Congo sont des milieux solides spécifiques pour la culture de *Rhizobium* (Vincent, 1970).

Les isolats et les souches de références sont cultivés sur ces deux milieux pour déterminer leur aspect, la texture et la couleur des colonies.

Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et *al.* 2006).

b) la vitesse se la croissance

Le bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7.6. Une réaction acide se traduit par le changement de coloration de BTB (annexe 01) vers le jaune, par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali, 2006).

II-Recherche d'enzymes spécifiques à la nodulation

La recherche des enzymes spécifiques pour l'établissement de la relation symbiotique (nitrate- réductase, uréase, pectinase et cellulase) et qui jouent un rôle lors du processus d'infection (nodulation) des racines par les bactéries, elle est réalisée en cultivant les souches sur milieux de culture contenant les substrats spécifiques de ces enzymes (Struffi et al., 1998)

II-1-Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Behringer, 1974) (Annexes 01) contenant 0,1% de KNO₃ (pv) pendant 5 jours avec agitation. Au terme de l'incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et nitrate réductase 2 (-naphtylamine dans l'acide acétique 5M). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue.

II-2-Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et les souches témoins sont cultivées sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH à 30 °C pendant 48 heures. La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,20µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C. La réaction positive est indiquée par la présence de colonies alcalinisantes ou acidifiantes le milieu.

II-3-Activité cellulosique

Les souches sont mises en culture sur le milieu YMA contenant 0.25% (p/v) de Carboxy Methyl Cellulose (CMC) pendant 5 jours. L'ensemencement sur le milieu YMA se fait à partir de culture fraîche de YMB. Après incubation à 28°C, les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de Rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 1h dans l'étuve à 28°C.

La solution colorante est remplacée par une solution de NaCl 1M, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30min puis vidées de cette solution.

Les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique.

II-4-Activité pectinolytique

Les souches bactériennes sont cultivées sur milieu YMA dont le mannitol est remplacé par l'Inositol 0,1% et additionné de 0,2% de pectine (Na-polygalacturonate), puis sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement avec l'eau courante puis avec une solution de rouge de ruthénium 0,05% pendant 30mn. Un halo décoloré autour des colonies indique une activité polygalacturonique.

III-la prestation symbiotique avec la plante hôte (test de nodulation)

III-1-La croissance bactérienne

Des Erlenmeyers de 250ml contenant 120 ml de TY, sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20mn. Une culture des souches est réalisée dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 120ml de TY et qui serviront d'inoculum. Après incubation 5ml de cet inoculum vont ensemencer 12 Erlenmeyers de 250ml contenant 100ml de TY.

La densité optique (D.O.₆₀₀) est mesurée à chaque heure de temps durant 24h. L'étalonnage de l'appareil s'effectue avec un milieu TY stérile (Somasegaran, 1994), la première mesure est prise directement après l'inoculation du premier Erlenmeyer avec 5ml de la suspension bactérienne.

Par non disponibilité des Erlenmeyers, on a remplacé ces derniers avec par des flacons de 250ml (Figure 6).

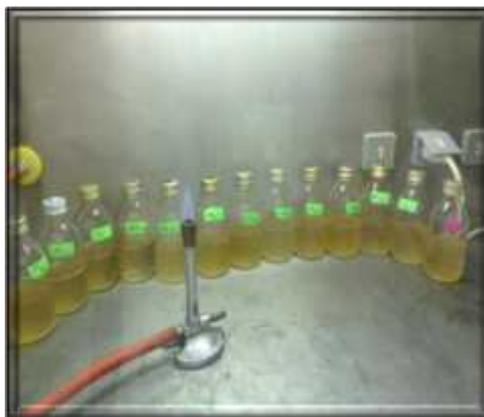


Figure 6: Flacons contiennent du TY

III-2 stérilisation des graines

Sous la hotte, les graines sont stérilisées à l'éthanol 95 % pendant 10 secondes, ensuite la solution d'éthanol est remplacée par l'eau de javel diluée à 10% pendant 15 min. Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile. On les laisse imbibées dans le dernier rinçage pendant 2 heures. (Figure 6)

Elles sont mises en germination sur des boîtes de Pétri en verre stériles contenant du coton imbibé ; les boîtes enveloppées du papier aluminium et mises à germer dans l'obscurité à température ambiante pendant 5 à 6 jours jusqu'à l'apparition des radicelles.



A

B

C

Figure 7:(A) : flacon remplis des graines de *P.coccineus* dans l'eau distillée stérile

(B): flacon remplis des graines de *P.vulgaris* dans l'eau distillée stérile

(C): Boite de Pétri contient des graines stériles après leur scarification mécanique

III-3 inoculation des jarres

La technique des jarres de Leonard selon la méthode de Vincent (1970) est utilisée pour évaluer l'aptitude des isolats à former des nodules sur les racines de la plante hôte.

Ce test est réalisé en conditions bactériologiquement contrôlées, mettant en place les deux partenaires « plante-bactérie » (Figure 9).

Dans cette étude, nous avons remplacé les jarres de Leonard par des flacons remplis de la solution nutritive recouverts du papier aluminium pour favoriser l'obscurité totale. Après une bonne germination des graines; ayant données des racines de 1 à 2 cm, sous la hotte, les graines sont prélevées délicatement en utilisant une pince stérile et placées (graines) dans chaque flacon à raison d'une graine par flacon contient d'une solution nutritive.

Enfin les flacons sont placés dans une chambre de culture à température ambiante avec une luminosité contrôlée (Figure 8).



Figure 8: Flacon contient la solution nutritive

A l'apparition des premières feuilles, les plantes sont inoculées à raison de 1ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO\lambda_{600} = 1$). Deux flacons ne sont pas inoculés et serviront de témoin.

On note que la plante en cause sera inoculée séparément par les souches de références.



Figure 9: flacon après leur inoculation



Chapitre III

Résultats et discussion

I-Etudes des caractères morphologiques des isolats

I-1-Examen microscopique :

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram est réalisée, qui va permettre de visualiser les bactéries au microscope optique.

L'examen microscopique des cellules bactériennes révèle des cellules bactérienne coccobacilles roses à Gram négatif (Beck, 1993) (Figure 10).



Figure 10: Observation microscopique des coccobacilles a Gram négatif (isolat S₂) sous microscope optique(x100)

1-2- Examen macroscopique des isolats

a)La croissance des isolats sur le YMA, YMA+ RC:

Après 24 heures d'incubation à 28°C, les isolats ainsi les souches de référence présentent un aspect des colonies circulaire, convexe, légèrement relevé de texture crémeuse, lisse et brillante (Figure A), d'autre part, les souches absorbent très peu le colorant tout en les mettant sur milieu YMA+RC, Ceci est observé chez la plus part des rhizobia (Jordan, 1984. Vincent, 1970) (Figure 11 :B).



Figure 11: L'aspect des colonies :

(A): sur YMA (isolat Z₂)

(B): sur YMA+rouge Congo (isolat S₂)

b) la vitesse de croissance

Tous nos isolats modifient le pH sur le milieu YMA+BTB après 24 heures d'incubation, et cela s'est produit par l'acidification totale du milieu (virage au jaune), ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide (Jordan, 1984 ; Beck et *al*, 1993; Pagano, 2008) (Figure12).



Figure 12: test de la vitesse de croissance :

(A): avant incubation (Isolat T₂)

(B) : après 24h d'incubation

II-Recherche d'enzymes spécifiques à la nodulation**II-1-Réduction des nitrates**

La transformation des NO₃ en ions NO₂ ne peut s'effectuer que sous l'action d'une enzyme ; la nitrate réductase qui est présente chez tous les organismes susceptibles de métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi quelques espèces de levure et les bactéries (Idrissi.2006).

Sur le milieu biologiques spécifique (TY+KNO₃), tous les isolats ainsi les souches témoin donnent une couleur rougeâtre, après l'addition des réactifs I et II du nitrate réductase, ou incolore après l'ajout de la poudre de zinc. Ce qui prouve la présence de cet enzyme. (Lindstrom et Lehtomâki .1988; Struffi et *al* 1998) (Figure 13).



Figure 13: test de nitrate réductase (résultat positive d'isolat m₂)

II-2-Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des Rhizobia à hydrolyser l'urée est initialement décrit par Javis et *al*, 1977.

L'alcalinisation du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique d'urée qui se traduit par un changement de couleur du milieu (rouge de Phénol est un indicateur de pH).

Le virage de couleur en rose violet indique que, tous nos isolats produisent une uréase sur milieu spécifique additionné d'urée (Mobley, 1992) (Figure 14).



Figure 14: test de l'urease :

(A): boîte témoin

(B): résultats positive d'isolat T₂

II-3-Activité cellulosique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose. Une fois la solution de NaCl rejetée, un halo-jaune-orange apparaît autour des colonies indiquant la présence d'une endoglucanase (Lindstrom et Lehtomâki, 1988) (Figure A)

Ceci montre que les rhizobia produisent l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, ce qui facilite la pénétration des rhizobia à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992.)

- Tous les isolats assurent une réaction positive sauf l'isolat m₂ (Figure 15 :B)

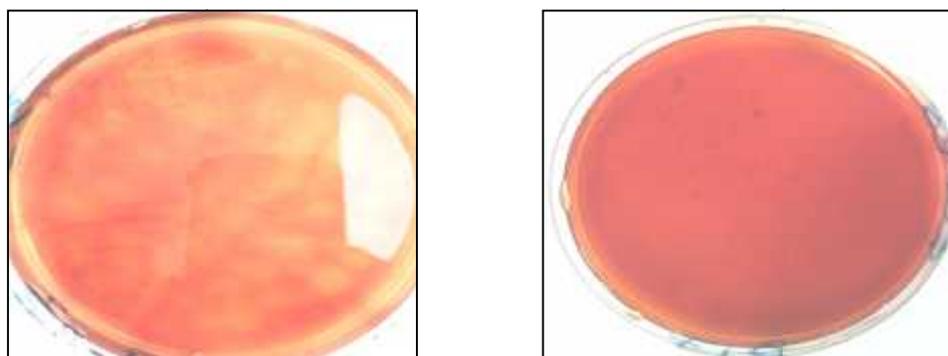


Figure 15: test de pictinase

(A) : Résultats positif (isolat z₂)

(B) : Résultats négatif (isolat m₂)

II-3-Activité pectinasique

Après rinçage à l'eau et l'addition du rouge de ruthénium, tous les isolats possèdent une activité polygalacturonasique (pectinase) qui se manifeste par l'apparition d'un halo décoloré autour des colonies sur un fond rose fuchsia (figure 16).



Figure 16 : test de pictinase (résultats positifs d'isolat z₂)

III-La prestation symbiotique avec la plante hôte (test de nodulation)

III-1- Mesure de la croissance bactérienne

La détermination des courbes de survie nous a permis de prendre les isolats en leur phase exponentielle dans une longueur d'onde de 600 nm qui peut être arrivée jusqu'à 1 (Beringer, 1974).

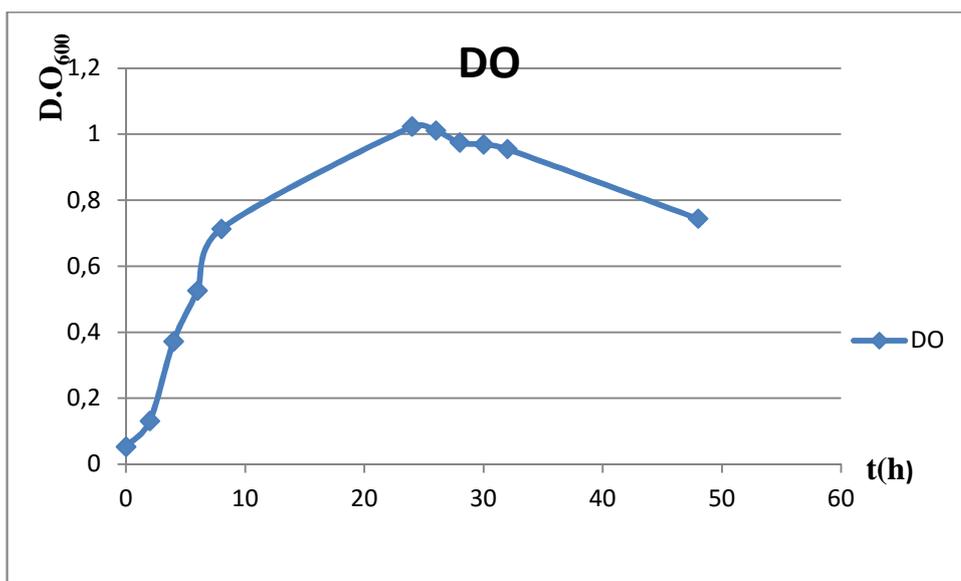


Figure 17: Courbe de croissance bactérienne de la souche témoin
- *Mezorhisobium ciceri* -

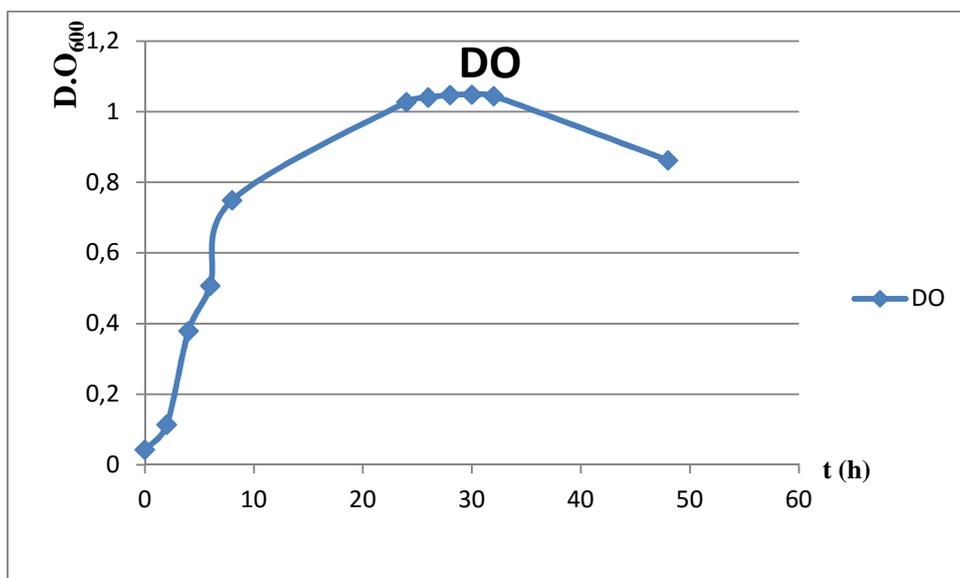


Figure 18: Courbe de croissance bactérienne de la souche témoin
- *Rhizobium sllae* -

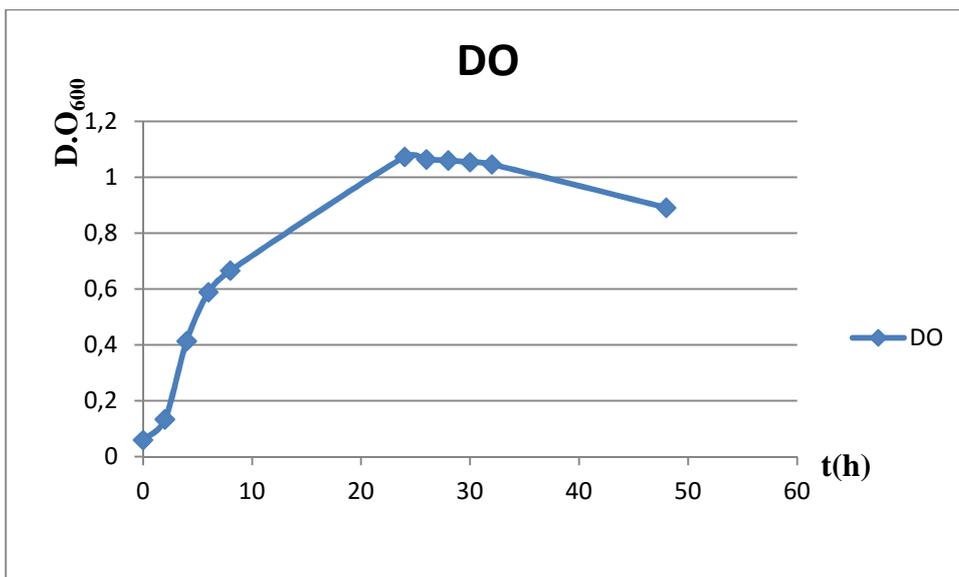


Figure 19: Courbe de croissance bactérienne de la souche S₂

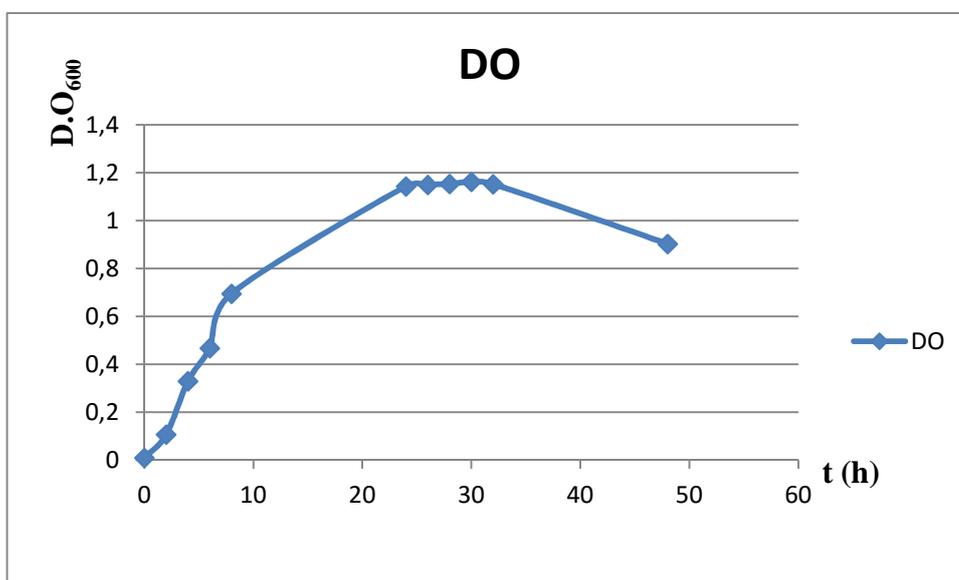


Figure 20: Courbe de croissance bactérienne de la souche m2

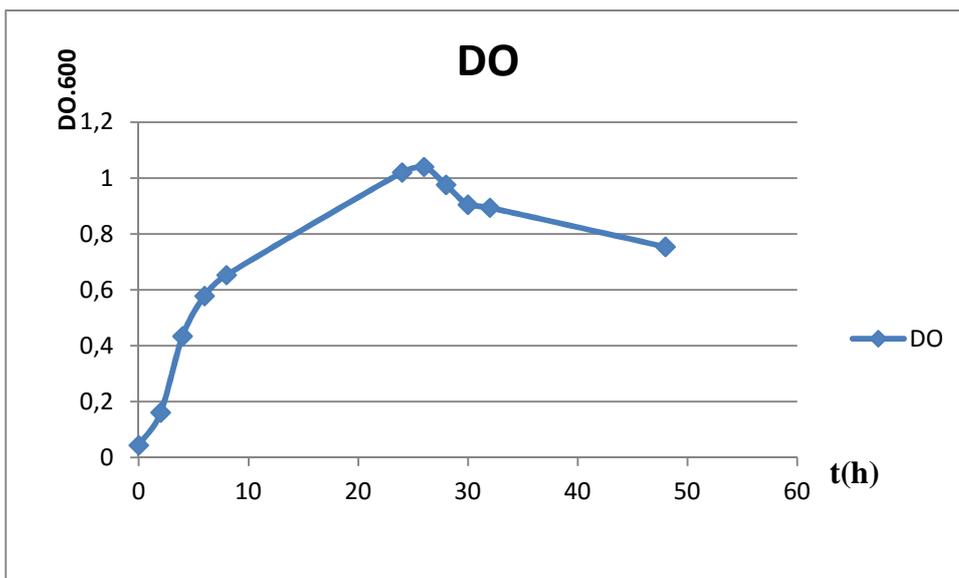


Figure 21: Courbe de croissance bactérienne de la souche T₁

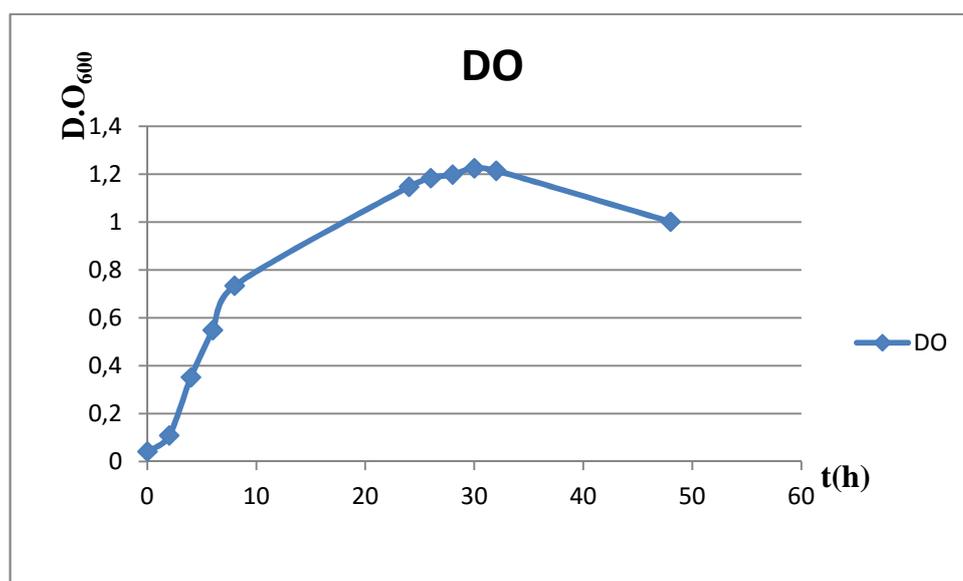


Figure 22: Courbe de croissance bactérienne de la souche B₁

III-2-Test de nodulation

On note que les isolats donnent des nodules plus grands en forme de grappe alors les autres souches rhizobiales: Mezo, donne très peu de nodules (1-3) et dont la taille réduite en comparant avec les nodules produits par les isolats pour les deux espèces, alors A6 n'a provoqué aucune infection racinaire (Figure 23)

Le résultat indique qu'il devrait être possible d'augmenter l'effet de nodulation et le rendement du haricot en combinant des cultivars adaptés avec des souches appropriées de rhizobia. Anthony et al, 2005.

Ce qui est prouvé par les travaux de Masson-Boivin *et al.* 2009 que la souche bactérienne *Sinorhizobium fredii* capable de former des symbioses fixatrices d'azote avec plus de 135 espèces des légumineuses.

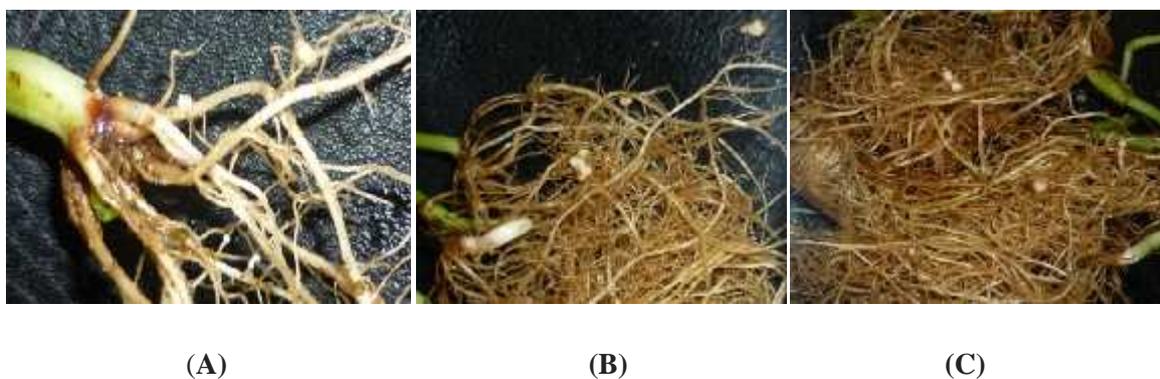


Figure 23: (A):représentation des nodules chez la plante qu'il est inoculé avec la souche -*Mesorhizobium ciceri*-
(B):représentation des nodules chez la plante qu'il est inoculé avec l'isolat B₁
(C) : représentation des nodules chez la plante qu'il est inoculé avec l'isolat S₂



Conclusion

Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons procédé à une caractérisation des bactéries nodulant deux espèces de la légumineuse de genre *Phaseolus* (*P.vulgaris* et *P.coccineus*), provenant des différentes régions algériennes : Guelma, Skikda, Annaba, selon les techniques usuelles propres aux rhizobia selon Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994, Jordan, 1984. Notre étude nous a permis de disposer d'une collection de 10 souches isolées de nodules racinaires des plantes, qui ont été ensuite caractérisées en présence de deux souches de référence.

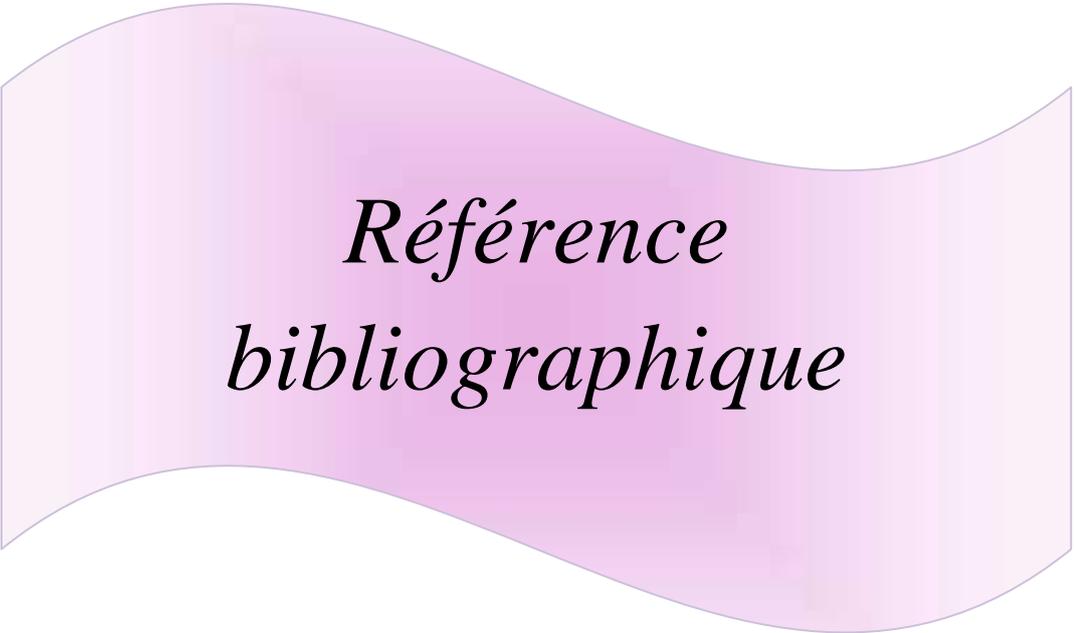
L'ensemble des résultats obtenus concernant l'étude morphologique et culturale, ainsi que l'examen microscopique, ont montré que l'ensemble des isolats présentent des caractères comparables au genre *Rhizobium*.

En effet l'aspect, la couleur, la forme des colonies sur le milieu YMA, YMA+ rouge Congo, la croissance rapide YMA+BTB peuvent nous orienter vers le genre *Rhizobium* (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). Ces mêmes souches possèdent les enzymes nécessaires pour infecter la plante et induire le processus de nodulation. Toutefois les prestations symbiotiques ont montré toute une hétérogénéité dans la taille et la forme des nodules ainsi induits.

Les tests biochimiques montrent la disponibilité des enzymes spécifiques nécessaire pour la symbiose chez les isolats examinées. Elles possèdent de la nitrate-réductase, enzyme contribue à l'assimilation de l'azote minérale. Les souches sont pourvues d'une uréase ainsi qu'une pectinase et une cellulase, qui sont impliqués dans le processus infectieux de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, ils facilitent la pénétration des rhizobia à travers les fibres par une dégradation des ponts glucidiques de la paroi cellulaire.

A travers ces résultats, nous pouvons admettre que nos isolats possèdent les enzymes nécessaires pour la nodulation

Le test de nodulation a révélé que toutes les souches étudiées donnent des nodules au niveau racinaires chez les deux espèces de la légumineuse (*Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus coccineus*), en revanche parmi les souches de références seule la souche Mezo a fait noduler le genre *Phaseolus*.



*Référence
bibliographique*

Références bibliographiques

Adams M.W., D. P. Coyne., J. H.C. Davis., P. H. Graham and C. A. Francis. (1985). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), p. 433-476. In R. J. Summerfield and E. H. Roberts (eds.), Grain Legume Crops, Collins London.

Anonyme. (2009) .Haricote .Microsoft [DVD] Microsoft corporation, 2008.

Baudoin J.P., Vanderborght T., Kimani P.M., Mwang'Ombe A.W. (2001). Grain legumes: Common bean. In: Ramaeker R.H. (ed.), *Crop Production in Tropical Africa*. Brussels, Belgium: DGCI (Directorate General for International Cooperation), 317-334.

Beck D.P., Materon L.A ., Afandi F. (1993). Pratical Rhizobium - legume technology manual, ICARDA(ed), Syria, p389.

Bélanger E. (1998). Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp. (Oxytropis Arctobla)* souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.

Berrada H et Benbrahim K. (2014). *Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives*. British Microbiology Research Journal 4(6): 616-639.

Beringer J.E. (1974) – R-factor tranfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198. Bernaerts, J.E. ; J. De Ley (1963) - A biochemical test for crown gall bacteria. Nature 199, 406-407

Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L. (2006). Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG 6: 97-110.

Brink, M. et Belay, G. (eds), (2006). Ressources végétales de l'Afrique tropicale I. Céréales et légumes secs. [Traduction de : Plant Ressources of Tropicale Africa I.Ce-reals and pulses. 2006]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas / Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas / CTA, Wageningen, Pays-Bas.154-157pp.

Brondani. (2008) .Genomics of Phaseolus Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), Genomics of Tropical Crop Plant. Springe, pp. 113- 143 Ghassemi F.

Broughton W.J. (2000). Interaction entre plantes et microorganismes. Cours de BMC.

Doyle J.J. et Luckow M.A. (2003).The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900-910.

Dupuy Y et Nougier P. (2005). Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.

El-Hilali I. (2006) : La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

Esseling J.J., Lhuissier F.G.P et Emons A.M.C. (2003). Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988.

Fahreus. (1957): the infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J.Gen.Microbiol.*16:354-381.

Figueiredo M.V.B., Martinez C.R., Burity H.A. et Chanway C.P. (2008) b. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187-1193.

Frank B. (1889). Uber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung.* 24 pp 377-38.

Freytag G.F. et Debouck D.G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *Sida Bot Misc* 23. Botanical Research Institute of Texas.

Gage D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic: nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 280-300.

Gepts P., Debouck D. (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7-53. In A. van Schoonhoven and O. Voysest (ed.) *Common beans: Research for crop improvement*. C.A.B. Intl, Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia.

Gepts P., Francisco J.L., Aragão Everaldo de Barros., Matthew W. Blair., Rosana Brondani. (2008). Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), *Genomics of Tropical Crop Plant*. Springe, pp. 113143.

Gepts P. (1990). Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) bean, *Economic Botany* 44:28-38.

Gepts P., Francisco JL., Aragão Everaldo de Barros., Matthew W. Blair., Rosana Brondani.,(2008). Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), *Genomics of Tropical Crop Plant*. Springe, pp. 113143.

Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F., Young N.D. (2005) Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137: 1228-1235.

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

Guiraud J.P. (1998): *Microbiologie alimentaire*. DUNOD. Paris.

Hassan S. and Mathesius U. (2012). The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* 63, 3429-3444.

Howard JB. et D.C. Rees. (2000). Structure of the nitrogenase protein components. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific.

Idrissi L. (2006): Etude et developpement de nouvelles methodes electrochimiques pour la determination des ions orthophosphate, nitrite, nitrate et ammonium. thèse de doctorat d'état de l'université Mohammed V Agdal. Maroc.

jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X. (1997)-Transfer of *Rhizobium loti* mediterraneum, and *Rhizobium tianshanense* to *Mezorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 895-898.

Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A et Stevens P. (2001). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

Kaplan L. (1981). What is the origin of the common bean? Eton. Botany 19:358-368.

Krichnan H.B. et Bennett J.O., (2007). Rhizobia that are important for nodulation. In: Gnanamanickam S.S. (Ed): Plant-Associated Bacteria. Springer. pp 25-75.

Laranjo M.C., Branco R., Soares L., Alho M.D.E., Carvalho S. Oliveira. (2002). Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. Journal of Applied Microbiology. Volume 92 Issue 6 Page 1043.

Lindstrom K. And S. Lehtomâki. (1988)- Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 50: 277-287. (rduction).

Lohar D., Stiller J., Kam J., Stacey G. et Gresshoff P.M. (2009). Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104: 277-285.

Madigan M. et Martinko. (2007). Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris. 1047p.

Maréchal R., Mascherpa JM., Stainier F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. *Boisiera* 28: 273.

Mateos P.F., Jiménez Zurdo J.I., chen J, Squartini A.S., HaaCK S.K., Martinez-Molina E., Hubbell D.H et Dazzo F.B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol.* 58(6):1816-1822.

Michelle I. et Lindeque., (2006). Diversity of root nodule bacteria associated with *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* species in south Africa. University of Protoria.

Mobley L.T.H. (1992)- Urease microbial. p. 327-346 In J. Lederbrgs (ed). *Encyclopaedia of microbiology.* Vol 4. Academic Press. Inc.

Oldroyd G. (2001). Dissecting symbiosis: Developments in Nod factor signal transduction. *Annals of Botany* 87, 709-718.

Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P. et Udvardi M.K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* 15: 531-535.

Pagano M.C. (2008). Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, 2008 (11) pp 498-508.

Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S. et Iaccarino M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* 234: 201-262.

Pelmont J. (2005). Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 180-201.

Peron. (2006). Productions légumières, 2^{ème} édition Lavoisier, 389P.

Pousset T.J. (2002). Engrais verts et fertilité des sols; 2^{ème} ed, Ed Agri décision; P303.

Pousset J. (2003). Engrais verts et fertilité des sols. 2^{ème} Edition Agridecisions, Paris.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 180–201.

Rasanen L. (2002). Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legume *Acacia*, these de doctorat de l'université de Helsinki. Finland Oldroyd, 220p.

Raven P.H., Evert R.F et Eichlorn S.E. (2000). Biologie végétale. 6^{ème} Edition de Boeck, Paris.

Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.

Struffi P., V. Corich ., A. Giacomini ., A. Benguedouar ., A. Squartini ., S. Casella ., M.P. Nuti. (1998) – Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 81-89.

Tereferwork Z. (2002). Diversity and phylogeny of *Rhizobium* galegae, and reflection on molecular evolution of *Rhizobium*-legume symbiosis, Department of applied chemistry and microbiology université Helsinki. 52p.

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

Werner D. (1992). symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

Référence webographique

<http://www.plantes.ca/comestibles/famille/phaseolus-coccineus.html>



Annexes

Annexe 01 :

Milieux de Culture et Solution Nutritive

Le milieu de culture YMB (Vincent, 1970) (g/l)

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0.5
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Extrait de levure	0.5
pH	6.8

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

Le milieu de culture YMA (Vincent, 1970) (g/l)

YMB	1000
Agar	18
pH	6.8

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

Le milieu de culture YMA + RC (Vincent, 1970) (g/l)

Solution stock de rouge Congo	10
YMB	1000
Agar	18
pH	6.8

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

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

Le milieu de culture YMA + BTB (Vincent, 1970) (g/l)

Solution stock de BTB	10
YMB	1000
Agar	18
pH	6.8

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

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

Le milieu de culture TY (Vincent, 1970) (g/l)

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0.87
Agar	18
pH	6.8

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

La composition de la solution nutritive (Fahreus ,1957) g/l

CaCl ₂	0.100
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.120
KH ₂ PO ₄	0.100

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.110

Citrate ferrique 0.005

*Solution stock des oligoéléments 1.0 ml

* Solution stock des oligoéléments : (g/l)

Solution des micro-éléments

H_3BO_3 2.86

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.03

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.14

pH 6.8

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

Annexe 02 :**Tableau 3 :** Mesure de la Croissance bactérienne(D.O₆₀₀) de la souche témoin*- Mezorhisobium ciceri -*

t(h)	0	2	4	6	8	24	26	28	30	32	48
DO	0,053	0,131	0,372	0,526	0,713	1,023	1,011	0,975	0,969	0,863	0,705

Tableau 4 : Mesure de la Croissance bactérienne(D.O₆₀₀) de la souche témoin*- Rhizobium sllae -*

t(h)	0	2	4	6	8	24	26	28	30	32	48
DO	0,043	0,114	0,379	0,507	0,749	1,027	1,04	1,047	1,048	1,044	0,862

Tableau 5 : Mesure de la Croissance bactérienne(D.O₆₀₀) de l'isolat S₂

t(h)	0	2	4	6	8	24	26	28	30	32	48
DO	0,06	0,134	0,414	0,589	0,666	1,073	1,064	1,06	1,054	1,046	0,891

Tableau 6 : Mesure de la Croissance bactérienne(D.O₆₀₀) de l'isolat m₂

t(h)	0	2	4	6	8	24	26	28	30	32	48
DO	0,01	0,107	0,33	0,468	0,695	1,143	1,149	1,153	1,162	1,152	0,903

Tableau 7 : Mesure de la Croissance bactérienne(D.O₆₀₀) de l'isolat T₁

t(h)	0	2	4	6	8	24	26	28	30	32	48
DO	0,044	0,161	0,434	0,578	0,653	1,02	1,04	0,976	0,905	0,894	0,754

Tableau 8 : Mesure de la Croissance bactérienne(D.O₆₀₀) de l'isolat B₁

t(h)	0	2	4	6	8	24	26	28	30	32	48
DO	0,042	0,109	0,352	0,549	0,734	1,147	1,183	1,198	1,2247	1,214	1,001

Détermination de la variabilité de l'effet de nodulation de la légumineuse *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus coccineus* par différentes souches rhizobiales

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Résumé

Parmi de nombreuses légumineuses, nous sommes intéressés au cours de ce travail à étudier la biodiversité des bactéries nodulant les deux espèces du genre *Phaseolus*, (*P.vulgaris* et *P.coccineus*), ce dernier a une importance dans l'alimentation humaine vu sa richesse nutritionnelle.

Nous avons effectuées un isolement et purification de 10 souches à partir des nodosités prélevés de différentes régions de l'Est de notre payé.

La caractérisation des isolats porte sur une étude morphologique et culturaux suivie d'une caractérisation phénotypiques qui basées sur la recherche d'enzymes spécifiques au processus de nodulation (le nitrate réductase, l'uréase, le cellulase et le pectinase) en présence de souches témoins, Cette étude montre que toute les souches présentent des caractères phénotypiques comparables aux *Rhizobium*.

Un test de nodulation est effectuée en mettant en évidence l'aptitude des isolats et les souches de références à noduler les racines de la plante hôte qui a montré après cinq semaines d'inoculation, l'apparition des nodules au niveaux des racines secondaires des deux légumineuses (*P.vulgaris* et *P.coccineus*) les nodules ainsi induits montrent une hétérogénéité dans la taille.

Mots clés : *Phaseolus*, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, nodulation, *Rhizobium*, symbiose

Laboratoire de recherche : laboratoire de biotechnologie, Université des frères Mentouri
Constantine1

Jury d'évaluation :

Président du jury : Gharzouli Razika (Maitre de conférence classe B - UFM Constantine),
Rapporteur : Saoudi Mouna (Maitre assistante classe A - UFM Constantine),
Examineur : Bechkri Sara (Maitre assistante classe A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 21/06/2016