



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

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 :

---

## Analyse phénotypique des isolats nodulant *Trigonella gladiata* Stev.

---

Présenté et soutenu par : Ayadi Amina

Le : 19 /06/2017

Amireche Roumaïssa

Jury d'évaluation :

Président du jury : Guergouri Ibtissem (Maître-assistante -UFM Constantine).

Rapporteur : Chabbi Rabah (Maître-Assistant « A » - UFM Constantine).

Examineurs Gaci Meriem (Maître-assistante - UFM Constantine).

Année universitaire  
2016 - 2017

## *Remerciements*

*Nous remercions **DIEU** le tout puissant de nous avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Nous adressons nos remerciements à notre encadreur **Mr CHABBI Rabah** pour tous les efforts qui a fait pour nous ; pour tous leur conseils et remarques, sa présence continue et son orientation.*

*Grand merci aux membres du jury : **Mme Guergouri Ibtissem** pour acceptant de présider le jury de soutenance et **Mlle Gaci Meriem** pour examiner et juger ce modeste travail.*

*Une mention spéciale pour **Mlle Mellal Hanene** pour leur soutien moral et nombreux conseils, remarques pertinents surtout ses patience durant la réalisation de notre travail.*

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

*A toute l'équipe du laboratoire des Biotechnologies du département de Microbiologie de l'université des frères Mentouri de Constantine pour leur soutien matériel et moral. Ainsi que tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à nos parents qui ont toujours été là pour nous.*

## ***Dédicace***

*Je dédie ce mémoire*

*A Mes chers parents larbi et Nadjet, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.*

*A Ma chère sœur Khadîdja et mon cher frère Sami.*

*A la personne qui était toujours là pour me soutenir et m'encourager et assurer de me rendre heureuse, à l'homme de ma vie Oualid.*

*A mon oncle Moncef.*

*A mes chères amies : Asma, Faiza, Maïssa, chahinez, Roumaïssa, Chaima, Imen, Amina, Zineb.*

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer ...*

*Et tous ceux que j'aime.*

***Amina***

## ***Dédicace***

*Merci mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve Et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « ya Karim »*

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents Kamel et Soria et qui m'ont dirigée et suivie durant toutes mes années d'étude, et aussi pour leur sacrifices, leur patience sans limite et l'éducation  
Qu'ils m'ont données, je leur dit merci mille fois.*

*Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude a Mon oncle : Djamel qui ma soutenue et aider dans mon travail et une langue vie pleine de santé et de prospérité a ma grand-mère Zhaira  
Mes tantes : Houria et Samira*

*Ma sœur et mes frères : Nibel, Rahim, Manef et Kassem.  
Toutes les familles : Amireche et Bouhzem.*

*Egalement je dédie ce travail à mes adorables amis :  
Nesrine, Rim, Lydia ,Oumaima ,Amina, Chahinez,  
Roumaïssa,Imen ,Chaima,Omnia,Zineb.*

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

***Maïssa***

## Résumé

Ce travail a été réalisé afin de mettre en évidence les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Poussée dans la région de l'Est algérien wilaya de Khenchela.

La caractérisation de 07 souches isolées porte sur une identification morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui englobe des tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels ont été réalisées, une souche de référence *Rhizobium nepotum* R08 ont été utilisées pour la comparaison.

Les résultats obtenus montrent que nos isolats sont des colonies homogène de forme circulaire de croissance rapide, des bacilles à Gram négatif, osmotolérantes et thermotolérantes peut vivre dans les sols acide ainsi que les sols alcalins, utilisée une large gamme de substrats carbonées et assimilent préférentiellement les disaccharides.

Sur la base des caractères étudiés, nos isolats portent les mêmes caractères phénotypiques des (BNL).

**Mots clés:** *Trigonella*, caractérisation, phénotypique, *Rhizobium*, BNL, nodules.

## **Abstract**

This work has been realized in order to highlighting the bacteria which have been isolated from the nodules of the plant the genus *Trigonella gladiata* Stev. In East Algeria Khenchela.

The characterization of 07 strains isolated relates a morphological study followed by a phenotypical characterization which includes also biochemical, physiological and nutritional tests, were performed, reference strain such *Rhizobium nepotum* R08 were used for comparison.

The results obtained show that our isolates are homogeneous colonies of fast-growing circular form, negative Gram bacilli ,osmotolerant and thermotolerant can survive in the acid soils like alkaline, used a wide range of carbonaceous substrates preferentially assimilate disaccharides.

On the basis of studied characters, strains get the same phenotypic characters of (BNL).

**Key words:** *Trigonella*, phenotypical, characterization, *Rhizobium*, nodules. BNL.

## ملخص

تم انجاز هذا العمل بهدف التعرف على البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للنبات البقولي *Trigonella* *Stev gladiata*. النامي في منطقة الشرق الجزائري ولاية خنشلة .  
الدراسة الوصفية 07 عزولات اعتمدت على تعرف مرفولوجي متبوع بدراسة وصفية مظهرية شملت اختبارات بيوكيميائية، فيسيولوجية وغذائية مع استعمال سلالة مرجعية R08 *Rhizobium nepotum* للمقارنة.  
النتائج المحصلة بينت أن عزلات ذات مستعمرات متجانسة ذات شكل الدائري وذات النمو السريع عسوية الشكل و سالبة الجرام مقاومة للملوحة و الحرارة قادرة على العيش في الاتربة الحمضية و الاتربة القلوية، تستعمل عدة مواد الكربونية مع تفضيل السكريات الثنائية.  
اعتمادا على الصفات المدروسة , عزلاتنا تحمل نفس الصفات المظهرية للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية للباقوليات(BNL).

الكلمات المفتاحية: *Trigonella*, وصف مظهرية *Rhizobium* , ,BNL, عقد جذرية

# Table des Matières

## Résumé

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

## Chapitre I : Revue bibliographique

I-Fixation biologique de l'azote.....	2
II- symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse .....	3
II-1-Les légumineuses .....	3
II-1-1-Classification des Légumineuses .....	4
II-1-2-La légumineuse <i>Trigonella L.</i> .....	5
II-1-2-2 -Description botanique ( <i>T.glabrata</i> Stev.).....	6
II-1-2-3-Taxonomie de la plante ( <i>T.glabrata</i> Stev).....	7
II-1-2-4 -Compositions de fenugrec .....	7
II-1-2-5- Principes actifs .....	8
II-1-2-6- Propriétés pharmacologiques .....	8
II-1-2-7-Agronomie.....	9
II-2- Généralités sur les rhizobia.....	9
II -2-1-Caractères généraux.....	9
II -2-1-1- Caractères morphologiques.....	9
II -2-1-2- -Caractères génétiques.....	10
II-2-2-Classification actuelle des rhizobiums.....	10
III- Etablissement de la symbiose rhizobienne.....	16
III-1-Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique .....	16
III-1-1- Pré échange de signal d'infection et déclenchement du nodule .....	16

III-1-2-L'infection.....	16
III-1-3-Développement du nodule et libération des bactéries .....	17
IV -La nodulation .....	18
IV-1-Les gènes <i>nod</i> .....	19
IV-2 -Les gènes <i>nif</i> .....	19
IV -3-Les gènes <i>fix</i> .....	19
IV-4-Les gènes de la plante hôte.....	20

## Chapitre II : Matériels et méthodes

I- Isolement des bactéries nodulant le Fenugrec ( <i>Trigonella gladiata</i> Stev.).....	21
I-1-Collecte des nodules.....	21
I-2 -Conservation des nodules.....	22
I-3- Isolement des souches à partir des nodules.....	22
-Stérilisation des nodules .....	23
-Test de stérilisation .....	23
-Ecrasement des nodules.....	23
I-3-4-Isolement des souches.....	23
II-Caractères culturaux.....	24
II-1- Principaux milieux de culture utilisés.....	24
II-2-purification des isolats .....	25
II-3 -Vitesse de croissance .....	25
II-4-Examens microscopiques et macroscopiques .....	25
II-4-1- Examens microscopiques.....	25
II-4-2- Tests de mobilité.....	25
II-5-Conservation des isolats.....	25

III -Caractérisation phénotypique des isolats .....	26
III-1-Tests nutritionnels.....	26
III-1-1-Utilisation de la source de carbone.....	26
III-1-2- Utilisation des acides aminés comme source d'azote.....	27
III-2-Tests biochimiques .....	27
III-2-1-Réduction des nitrates .....	27
III-2-2-Hydrolyse de l'urée .....	27
III-2-3-Activité cellulolytique .....	28
III-2-4- Activité pectinolytique .....	28
III-2-5-Recherche de l'oxydase.....	28
III-2-6-Recherche de la catalase.....	28
III-3-Tests physiologiques.....	29
III-3-1-Tolérance au NaCl.....	29
III-3-2-Effet de la temperature .....	29
III-3-3-Effet du pH .....	29

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

I -Test de stérilisation.....	30
II -Caractères culturaux .....	30
II -1-Croissance sur milieu YMA+rouge Congo.....	30
II-2- Croissance sur le milieu GPA contenant le pourpre de bromocrésol (BCP) .....	31
II-3- Croissance sur le milieu YMA.....	31
II-4- La vitesse de croissance .....	31
III- Caractères microscopique et macroscopique .....	32

III- 1-Caractères microscopique .....	32
III-2- Teste de Mobilité .....	33
IV - Caractérisation phénotypique des bactéries .....	33
IV -1-Teste nutritionnels .....	33
IV -1-1-Utilisation des sucres comme source de carbone .....	33
IV -1-2-Utilisation des acides aminés comme source d'azote .....	35
IV -2- Tests biochimiques .....	36
IV -2-1-Réduction des nitrates .....	36
IV -2-2-Hydrolyse de l'urée .....	37
IV -2-3-activité cellulosique.....	38
IV -2-4-Activité pectinolytique .....	39
IV -2-5-Recherche d'oxydase et de la catalase .....	40
IV -3-Tests physiologiques .....	40
IV -3-1-Tolérance au Chlorure de sodium .....	40
IV -3-2-Effet du pH sur la croissance des isolats .....	42
IV-3-3-Température de croissance .....	44
<b>Conclusion .....</b>	<b>46</b>
<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>48</b>
<b>Annexe</b>	

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 :</b> classification actuelle des rhizobiums (Berrada et Fikri-Benbrahim ,2014) (Weir, B.S, 2016).....	11
<b>Tableau 2 :</b> Souches utilisées dans cette étude.....	26
<b>Tableau 3 :</b> Croissance des isolats en présence de différents sucres.....	34
<b>Tableau 4:</b> Croissance des isolats en présence de différents acides aminés .....	36
<b>Tableau 5:</b> résultats de teste d'oxydase et catalase.....	40
<b>Tableau 6 :</b> Croissance des isolats à différentes températures .....	35

## Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> <i>Trigonella gladiata</i> Stev .....	6
<b>Figure 2 :</b> formation d'un nodule (Tortora <i>et al.</i> , 2003).....	18
<b>Figure 3 :</b> Conservation des nodules (Vincent, 1970).22	
<b>Figure 4 :</b> Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).....	24
<b>Figure 5 :</b> Test de stérilisation .....	30
<b>Figure 6 :</b> croissance de l'isolat sur le milieu YMA+RC .....	30
<b>Figure 7a:</b> Acidification de milieu GPA+BCP .....	31
<b>Figure 7b:</b> Aucune croissance sur le GPA+BCP .....	31
<b>Figure 8:</b> croissances de l'isolat sur milieu YMA .....	31
<b>Figure 9:</b> Acidification du milieu YMA+BTB.....	32
<b>Figure 10:</b> Observation microscopique de l'isolat après coloration de Gram.....	32
<b>Figure 11:</b> Résultat de Mannitol mobilité.....	33
<b>Figure 12:</b> Croissance des isolats en présence de quelques sucres.....	35
<b>Figure 13 :</b> Croissance des isolats en présence de quelques acides aminés .....	36
<b>Figure 14 :</b> réduction de nitrate positif .....	37
<b>Figure 15:</b> uréase positif.....	38
<b>Figure 16:</b> Test de cellulase positif .....	39
<b>Figure 17:</b> Test de Pectinase positif .....	39
<b>Figure 18a :</b> Tolérance au NaCl des isolats est souche de référence après 24 heures .....	41
<b>Figure 18b :</b> Tolérance au NaCl des isolats est souche de référence après 48 heures .....	42

<b>Figure 19a</b> : Tolérance au pH des isolats est souche de référence après 24 heures .....	43
<b>Figure 19b</b> : Tolérance au pH des isolats est souche de référence après 48 heures .....	43
<b>Carte 1</b> : Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	21

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique

**ADNr**: Acide Désoxyribo-Nucléique Ribosomal

**atm**: atmosphère

**BCP**: Pourpre de Bromocrésol

**BTB** : Bleu de Bromothymol

**BNL** : Bactéries Nodulant les Légumineuses

°C : degrés Celsius

**CMC**: Carboxy-Méthyl-Cellulose

**DO**: Densité Optique

**GPA**: Glucose Peptone Agar

*hsn* : *host specific nodulation*

**KNO<sub>3</sub>** : Nitrate de potassium

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NaClO** : Hypochlorite de sodium

**L.** : de Litardière

**LCO** : lipochitooligosaccharide

**pH**: potentiel d'Hydrogène

**psym** : plasmide symbiotique

**RC**: Rouge Congo

*R*: *Rhizobium*

*T* : *Trigonella*

**T Y**: Tryptone Yeast

*sp* : *species* (espèce non déterminée)

**Stev.** : Steven ex M.Bieb

**µm** : micromètre

**YM A**: Yeast Mannitol Agar

**YMB**: Yeast Mannitol Broth

# Introduction

La fixation biologique de l'azote, qui est la transformation de l'azote gazeux atmosphérique par des microorganismes du sol en azote combiné assimilable par les plantes peut constituer une alternative à l'utilisation d'engrais chimique azoté ou du moins permettre de réduire son utilisation dans les systèmes agricoles.

Les légumineuses jouent un rôle important dans le maintien de la productivité en agriculture. Elles sont capables d'établir un symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec des bactéries du sol appelées BNL ou « Bactéries Nodulantes des légumineuses » (Moulin., 2002).

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

La région de l'Est Algérien présente un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, subhumide et semi-aride, elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées (FAO., 2006). Parmi elles les espèces du genre *Trigonella L.* (Fenugrec)

Le Fenugrec c'est une plante médicinale, herbacée annuelle de la famille des Fabaceae, comme les autres légumineuses est une bonne source des protéines alimentaires pour la consommation de l'homme et les animaux ...etc.

Dans le cadre du travail relatif à ce mémoire, nous sommes fixés l'objectif suivant : Analyses phénotypique des isolats nodulants *Trigonella gladiata* Stev .poussé spontanément dans la région de Khenchela. Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- isolement des bactéries à partir des nodules.
- étude morphologique et microscopique des isolats.
- une étude comparative entre les isolats et les souches de référence par une caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests :
  - recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase, pectinase, oxydase, catalase).
  - tests nutritionnels (source de carbone, source d'azote).
  - effet des facteurs abiotiques (pH, T°, NaCl).

# Chapitre 1

## Revue Bibliographique

## I-Fixation biologique de l'azote

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote (Pujic P., Normand., 2009). C'est un constituant important dans l'élaboration de nombreuses molécules tels que : les protéines les acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et divers composés primaires et secondaires des plantes (Hopkins., 2003).

La fixation biologique de  $N_2$  est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Les organismes assimilateurs de  $N_2$  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).

La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes, parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac, Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, la plante maintient les nodules en conditions de micro-oxie grâce au parenchyme nodulaire pendant que la leghémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène (Hopkins., 2003 ; Ott *et al.*, 2005).

Dans le système biologique fixateur de  $N_2$  les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de  $N_2$  et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères (pression de 250-1.000 atm de  $N_2$  et température de 450°C) (Hopkins., 2003).

La fixation biologique de l'azote est le processus biochimique le plus important après l'assimilation du  $CO_2$ . Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Vincent., 2002).

certaines bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et de la retourner au sol sous forme d'ions ammonium ( $NH_4^+$ ) qui seront ensuite transformés en une forme d'azote directement assimilable par les plantes ( $NO_3^-$ ) grâce à la nitrification. Les bactéries formant des associations symbiotiques sont les plus importantes en termes de quantité d'azote fixé et, *Rhizobium* et *Bradhyrhizobium* sont les genres les plus communs (Raven., *et al.*, 2003).

Dans cette association symbiotique, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiont. 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).

## **II- symbiose *Rhizobium*-légumineuse**

Les bactéries de la famille des *Rhizobiacées* en général peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation d'un organe spécialisé, le nodule, et offre un micro-habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse qui fournit à la plante hôte de l'azote sous forme assimilable  $\text{NH}_3$  (Dommergues *et al.*, 1999). On a donc bien une symbiose, c'est à-dire une association à bénéfice réciproque. Cependant, la réduction de l'azote atmosphérique est un processus très coûteux en énergie (Smil., 2002).

L'optimisation de la symbiose entre les légumineuses et le microsymbiont exige la présence dans la rhizosphère de souches compatibles, compétitives et infectives qui sont hautement effectives pour la fixation de l'azote et présentes en nombre suffisant pour maximiser la nodulation (Vessey et Chemining., 2006).

### **II-1-Les légumineuses**

Une légumineuse désigne une plante appartenant à la famille des Fabacées .C'est l'une des plus importante familles parmi les dicotylédone qui ont la propriété de former une association symbiotique avec les bactéries *Rhizobiums*. Elles constituent le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques dans de bonnes conditions de nodulation (Raven *et al.*, 2000), parmi les plantes les plus étudiées, Le soja, l'arachide, le haricot, les pois, les fèves et les lentilles (Patriarca *et al.*, 2004 ;Gage., 2004; Stacey *et a.*, 2006).

La famille des légumineuses est l'une des familles végétales les plus utiles à l'homme, que ce soit dans le domaine alimentaires, industrielles, économique, écologique ou agronomique :

Les graines des légumineuses sont des aliments d'excellente qualité, elles constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales selon la légumineuse considérée. Les protéines peuvent représenter de 17 et 27 % du poids des graines soit deux à trois fois plus que les graines des céréales majeures (Graham et Vance., 2003 ; Simon., 2005 ; Fyad-Lameche., 2007).

Dans l'industrie, les légumineuses représentent une source très importante de matière première : pour la production de dérivés alimentaires tels que les huiles, les farines et les conserve...etc et pour la production des produits cosmétiques et pharmaceutiques (Lee *et al.*, 2007).

Les légumineuses améliorent les pratiques agricoles et contribuent au maintien de la fertilité des sols par l'accumulation des concentrations importantes d'azote dans leurs tissus (Simon., 2005).

écologiquement, les légumineuses sont responsable pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables (Wani *et al.*, 1995 ; Chalck., 1998).

Elles jouent aussi des rôles très importants dans la lutte contre l'érosion, la désertification et la dégradation des sols (Thami et El Mzouri., 2000).

### **II-1-1-Classification des Légumineuses**

La famille des légumineuses ou Fabacées (*Fabaceae*) est classée parmi les Angiospermes, en nombre d'espèces (après les Orchidacées et les Astéracée) avec plus de 20000 espèces répartition mondiale, classées en environ 727 genres (Cronk *et al.*, 2006). Les espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.* 2001). Les formes arborescentes sont prédominantes dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont., 2005).

Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s'entendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles (Doyle., 1994 ; De Ladjudie *et al.*, 1998 ; Dommergues *et al.*, 1999 ; Doyle et Lucknow., 2003) :

### - *Les Mimosoideae*

La sous-famille des Mimosoideae, comprend environ 3000 espèces regroupées dans environ 77 genres (Cannon., 2008).

### - *Les Caesalpinioideae*

La sous-famille des Caesalpinioideae, considérée comme la plus primitive, regroupe environ 4200 espèces dans environ 162 genres (Simon., 2005 ; Cannon., 2008).

### - *Les Papilionoideae*

Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995 rédigés par Ziada et Bellir, 2014), d'une évolution plus récente, comprend quelques 14.000 espèces aux fleurs irrégulières, regroupées dans environ 476 genres (Lewis *et al.*, 2003).

Très peu d'espèces chez les *Cesalpinioideae* sont nodulées, alors que la plupart des espèces de *Papilionoideae* d'intérêt agronomique le sont (soja, luzerne, pois, haricots, Arachide...) (Doyle., 2011).

## II-1-2-La légumineuse *Trigonella L.*

Le Fenugrec (*Trigonella L.*) est une plante, herbacée annuelle de la famille des Fabaceae (Burnie *et al.*, 2006).

Le nom du genre, *Trigonella* signifiant «petit triangle» Ressemblent à la forme triangulaire de ses petites fleurs blanc-jaunâtre (Bas., 2006).

Il existe des divergences remarquables dans la gamme des espèces déclarées de fenugrec (environ 70-97) dans la littérature (Vasilchenko.,1953 ; Fazli., 1967) cependant, les taxonomies anciennes comme Linnaeus ont explicitement accentué Sur l'existence de 260 espèces (Basu., 2006), à travers les espèces mentionnées de fenugrec, les suivantes Sont principalement célébrés quant à leurs propriétés médicinales et pharmaceutiques (Basu .,2006): *T. foenum graecum*, *T. balansae*, *T. corniculata*, *T. maritima*, *T. spicata*, *T. occulta*, *T. polycerata*, *T. calliceras*, *T. cretica*, *T. caerulea*, *T. lilacina*, *T. radiata*, *T. spinosa*. Parmi lesquels *T. foenum-graecum* est largement Cultivé dans le monde entier (Petropoulos ., 2002).

Le fenugrec est également connu comme une culture épicée mondiale cultivée dans les principaux continents (Selon le sol et les conditions climatiques) à travers le monde, y compris des parties de l'Afrique du Nord, Méditerranée Europe, Russie, Moyen-Orient, Chine, Inde, Pakistan, Iran, Afghanistan, pièces de l'Extrême-Orient et de l'Asie du Sud-Est, de l'Australie, des États-Unis, du Canada et de l'Argentine (Acharya., Thomas *et al.*, 2006 ; Acharya., Blade., Mir., 2007).

Le fenugrec dans L'arabe s'appelle Hulba, en Angleterre appelé fenugreek ou fenigrec, en Pakistanais et Indiens appelés Methi, en italien appelé Fieno Greco, et en français appelé Senegre (Petropoulos ,2002 ; Mehrafarin *et al.*, 2011).

De nombreux experts conviennent à l'unanimité que l'ancêtre sauvage direct du fenugrec est *T. gladiata* Stev. Cela diffère largement de *T. foenum-graecum* en raison de l'assemblage d'attributs comme le plus petit taille et la tuberculation des graines (Petropoulos, 1973). Il est donc probable que vous croyez que les espèces *T. foenum graecum* évoluait naturellement à partir de *T. gladiata*, car il avait éventuellement contribué à empêcher l'extinction de *T. foenum-graecum* (Mehrafarin *et al.*, 2011).

#### **-Description botanique (*T.gladiata* Stev.)**

Fleurs solitaires ou rarement géminées, sessiles à l'aisselle des feuilles. Gousses longuement apiculées, plus ou moins arquées Gousse longue de 2-4 cm, brusquement rétrécie en bec de 1-2 cm (figure). Graines fortement tuberculées. Fleurs blanchâtres, de 8-10 mm de long. Plante plus ou moins prostrée, velue-hispide, en particulier sur la gousse, haute de 5-15cm au plus (Quizel et Santa., 1962).



**Figure 1** : *Trigonella gladiata* Stev.

### **-Taxonomie de la plante (*T.gladiata* Stev.)**

Règne : Plantae

Sous-Règne : Trachiobionta

Division : Magnophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Trigonilla*

Espèce : *T.gladiata* Stev.

### **-Compositions de fenugrec**

La graine de Fenugrec concentre d'importants composants essentiels pour la santé contient des phosphores du fer, du soufre, des acides nicotinique, des alcaloïdes saponines (l'origine de ses propriété stimulante de l'appétit), flavonoïdes, glucide, vitamine A et B1, C. magnésiums, calcium. Lécithine. Protéine 30%.des saponines stéroïdes (diosgénine et yamgénine. qui contribuent à la synthèse du cholestérol et des hormones sexuelles) (Le Folc'h E., 1983).

Le fenugrec comme les autres légumineuses est une bonne source des protéines alimentaires (environ 20-30 %), il contient les acides gras avec un pourcentage de 05 à 10% qui sont principalement l'acide linoléique, l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide palmitique, les glucides totaux représentent de 45 à 65 % de sa composition avec 15% degalactomannane (une fibre soluble) (Schryver., 2002 ; Nazar *et al.*, 2007).

Les grains de fenugrec sont aromatique, amères, non toxique, antibactérien (Mehani et Segni., 2012).

### **II-1-2-5- Principes actifs**

Il est utilisé comme une épice de cuisson et un agent aromatisant (Hajimehdipoor *et al.*, 2010), est très recommandé, généralement en cas de manque d'appétit (Harchane *et al.*, 2012).

Depuis plusieurs siècles, des recherches modernes ont également démontré que les graines et les feuilles de fenugrec Sont utiles dans le traitement d'un certain nombre de maladies, y compris la réduction efficace de la glycémie et le taux de cholestérol sanguin chez les animaux et les sujets humains dans les essais expérimentaux (Acharya *et al.*, 2006).

Cette plante est également consommée comme fortifiante par les femmes après l'accouchement, elles sont traditionnellement utilisées pour la prise de poids. Il est aussi reconnu pour combattre et réduire la chute de cheveux (Mekkiou., 2005; Salhi., *et al.*, 2010).

### **II-1-2-6- Propriétés pharmacologiques**

La graine de fenugrec est traditionnellement utilisée par voie orale pour faciliter la prise de poids et par voie externe comme émollient sous forme de cataplasme dans le traitement des inflammations locales : furoncles, abcès, durillons et eczémas (Bruneton., 2009).

Cette plante est très intéressante dans le traitement des facteurs de risque cardiovasculaires. Le fenugrec pourrait avoir un effet préventif sur l'apparition de certains types de cancers (Aggarwal *et al.*, 2006), en particulier du colon (Raju *et al.*, 2004 ; Devasena *et al.*, 2007) , du sein (Amin., 2005), et de la vésicule biliaire (Rai., 2006). Il a été envisagé d'utiliser ses propriétés anti-oxydantes en tant qu'anticancéreux (Sur *et al.*, 2001).

Les graines ou des fractions des graines du fenugrec utilisé dans le traitement du diabète sur un modèle de diabète de type 1 ont été plus souvent testées en curatif qu'en préventif (Ribes *et al.*, 1986 ; Ali *et al.*, 1995 ; Vats *et al.*, 2003).

### **II-1-2-7-Agronomie**

La production agronomique de la culture du fenugrec a été bien étudiée et signalée dans les régions arides et Régions semi-arides du monde et a été bien documenté dans la littérature primaire (Basu *et al.*, 2007 ; Zandi *et al.*, 2013).

Les facteurs environnementaux climatiques et édaphiques (facteurs externes) ainsi que la formation génétique (Condition interne) sont largement responsables des processus métaboliques dans la culture du fenugrec (Basu., *et al* 2009)

### **II-2- Généralités sur les rhizobia**

Les rhizobia furent isolés pour la première fois par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote qui nomma la bactérie qu'il isola *Bacillus radicola*.

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 en 1889 car ce microorganisme vit dans les racines.

#### **II -2-1-Caractères généraux**

##### **II -2-1-1- Caractères morphologiques**

Les rhizobia sont des bactéries du sol, bacilles Gram négatives, strictement aérobies et non sporulant, possédant une forme de bâtonnets (Jordan 1884), 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 0,9µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Jordan., 1884).

##### **-la forme bactériode**

A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactériode de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry *et al.*, 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium léguminosarum*, 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).

## II -2-1-2-Caractères génétiques

Les souches de *Rhizobium* nodulants les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (Patrícia *et al.*, 1998; Raposeiras *et al.*, 2002).

La spécificité de l'hôte est codée par les gènes du plasmide sym, un échange dans ce plasmide signifie un échange dans la spécificité de l'hôte (Pelmont., 1995).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (Psym) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti*. Les gènes responsables de la nodulation (Nod) et de la fixation de l'azote (Fix, Nif) dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique, des gènes codent pour des bactériocines et de la production des pigments sont aussi présents (Werner., 1992 ; Pelmont., 1995 ; Patrícia *et al.*, 1998).

L'existence de séquences répétitives d'ADN est une caractéristique du génome de *Rhizobium*. Elles peuvent fournir des emplacements pour la recombinaison et des réarrangements génomiques ainsi des délétions d'ADN, ayant pour résultat la perte ou des changements des propriétés symbiotiques. En conséquence, cette instabilité génétique compromet l'utilisation des souches de *Rhizobium* dans la production commerciale d'inoculum (Patrícia *et al.*, 1998; Raposeiras *et al.*, 2002).

## II-2-2-Classification actuelle des rhizobiums

La classification des rhizobiums a été passée par un changement substantiel au cours des dernières années en raison de l'ajout de plusieurs genres et espèces de ce groupe de bactéries importantes.

La première classification des rhizobia a été réalisée sur la base des groupes d'inoculation croisée ; elle comportait un seul genre ; le genre *Rhizobium* avec six espèces : *R. leguminosarum* ; *R. meliloti* ; *R. trifolii* ; *R. phaseoli* ; *R. lupiniet R. japonicum*. (Zakhia *et al.*, 2001 ; Sahgal et Johri., 2003) .

Actuellement la taxonomie bactérienne moderne se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (surtout ADNr 16S comme marqueur taxonomique, les protéines totales, les acides gras, ...). Ainsi, la famille des *Rhizobiacées* incluse 6 genres qui sont *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*,

*Allorhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* et connus collectivement sous le nom de *rhizobia* (Tighe *et al.*, 2000 ; Ndiaye *et al.*, 2002).

Sur la base de la vitesse de croissance *in vitro*, les *Rhizobium* sont été ensuite reclassés en deux groupes : groupe des bactéries à croissance rapide et celui des bactéries à croissance lente. Ces bactéries sont actuellement connues pour les capacités symbiotiques. ainsi les genres *Rhizobium* ; *Sinorhizobium* ; *Mesorhizobium* ; *Ochrobactrum* ; *Allorhizobium* ; *Azorhizobium* ; *Methylobacterium* ; *Bradyrhizobium* ; *Blastobacter* ; *Devosia* ( classe des  $\alpha$ -protéobactéries ); *Burkholderia* et *Ralstonia* (classe des  $\beta$  protéobactéries) (Garrity *et al.*, 2004) ainsi que certaines  $\delta$ -protéobactéries (Benhizia *et al.*, 2004) forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuses (Weir ., 2006 ).

**Tableau 1** : classification actuelle des rhizobiums (Berrada et Fikri-Benbrahim ,2014) (Weir., B.S., 2016).

Genre espèce	Source d'isolement
<b>Classe: Alphaproteobacteria</b>	
<b>Ordre: Rhizobiales</b>	
<b>Famille: Rhizobiaceae</b>	
<b>Genre: Rhizobium</b>	
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>Symbiovarviciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>Symbiovartrifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>Symbiovarofficinalis</i>	<i>Galegaorientalis</i>
<i>Symbiovarorientalis</i>	<i>Galegaofficinalis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
<i>Symbiovarmimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunianatans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovargallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>

<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Symbiovargiardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodiumsinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	Plusieurs espèces de légumineuses
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryzaalta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisumsativum</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsisthaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caraganaintermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropisglabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	usine de dunes côtières
<i>R. radiobacter</i>	*
<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*

Actuellement, il y'en a 49 espèces du genre rhizobia (et 11 pas du genre rhizobia).

Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)

*Rhizobium* en

### Genre: Ensifer

<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>Symbiovarfredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>Symbiovarsiensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>E. terangae</i>	les plantes hôtes différentes
<i>Symbiovaracaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense (Formerly: Sinorhizobiumxingianense)</i>	<i>Glycine max</i>
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>

*E.numidicus*

*Medicago sativa*

Il ya actuellement 17 espèces de genre de bactérie dont Ensifer est en Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)

**Genre: Shinella**

*S. kummerowiae*

*Kummerowia stipulaceae*

Le genre *Shinella* contient actuellement une seule espèce rhizobia. Weir, B.S. (2016)

**Famille: Phyllobacteriaceae**

**Genre: Mesorhizobium**

*M. loti*

*Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.*

*M. huakuii*

*Astragalus sinicus*

*M. ciceri*

*Cicer arietinum*

*M. tianshanense*

*Glycyrrhiza pallidiflora*

*M. mediterraneum*

*Cicer arietinum*

*M. plurifarum*

*Acacia, Chamaecrista, Leucaena,*

*Prosopis,*

*M. amorphae*

*Amorpha fruticosa*

*M. chacoense*

*Prosopis alba*

*M. septentrionale*

*Astragalus adsurgens*

*M. temperatum*

*Astragalus adsurgens*

*M. thiogangeticum*

\*

*M. albiziae*

*Albizia kalkora*

*M. caraganae*

*Caragana spp.*

*M. gobiense*

Wild legumes

*M. tarimense*

Wild legumes

*M. australicum*

*Biserrula pelecinus*

*M. opportunistum*

*Biserrula pelecinus*

*M. metallidurans*

*Anthyllis vulneraria*

*M. alhagi*

*Alhagi*

*M. camelthorni*

*Alhagi sparsifolia.*

*M. abyssinicae*

Différents arbres agroforestiers

de légumineuses

*M. muleiense*

*Cicer arietinum*

*M. hawassense*

Différents arbres agroforestiers

de légumineuses

*M. qingshengii*

*Astragalus sinicus*

*M. robiniae*

*Robinia pseudoacacia*

*M. shonense*

Différents arbres agroforestiers

de légumineuses

*M. shangrilense*

*Caragana espèce*

*M. silamurunense*

*Astragalus espèce*

*M. tamadayense*

*Anagyris latifolia, Lotus berthelotii*

Actuellement il ya 21e espèces du genre rhizobia dont une (1) non rhizobia. Le genre *Mesorhizobium* en Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)

**Genre: Phyllobacterium**

*P. trifolii* *Trifolium pratense*

Le genre *Phyllobacterium* contient actuellement trois espèces de rhizobia. Le/ la

*Phyllobacterium* en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

**Famille: Methylobacteriaceae****Genre: Methylobacterium**

*M. nodulans* *Crotalaria* spp.

Le genre *Methylobacterium* contient une seule espèce *Rhizobia*, Le/la

*Methylobacterium* en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

**Genre: Microvirga**

*M. lupini* *Lupinus* sp.  
*M. lotononidis* hôte légumineuse Different  
*M. zambiensis* hôte légumineuse Different

Le genre *Microvirga* contient actuellement trois espèces de

*Rhizobia*. *Microvirga* en nouvelle -zelande. Weir, B.S. (2016)

**Famille: Brucellaceae****Genre: Ochrobactrum**

*Ochrobactrumcytisi* *Cytisus*  
*Ochrobactrum lupini* *Lupinus albus*

Le genre *Ochrobacterium* contient actuellement deux espèces de rhizobia. Le/la

*Ochrobacterium* en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

**Famille: Hyphomicrobiaceae****Genre: Azorhizobium**

*A. caulinodans* *Sesbania rostrata*  
*A. dobereinereae* *Sesbania virgata*  
*A. oxalatiphilum*

Le genre *Azorhizobium* se compose actuellement de 2 espèce

es Weir, B.S. (2016)

**Genre: Devosia**

*Devosianeptuniae* *Neptunianatans*

Le genre *Devosia* contient actuellement une seule espèce rhizobia

pas une espèce rhizobia potentiellement. Weir, B.S. (2016) (et une 1 qui n'est

**Famille: Bradyrhizobiaceae****Genre: Bradyrhizobium**

*B. japonicum* *Glycine max, Glycine soja*  
*B. elkanii* *Glycine max*  
*B. liaoningense* *Glycine max*  
*B. yuanmingense* *Lespedeza*  
*B. betae* *Betaevulgaris*  
*B. canariense* *Genisteeae et Loteae*  
*B. iriomotense* *Entada koshunensis*  
*B. jicamae* *Pachyrhizus erosus*

<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizuserosus</i>

Il ya actuellement 9 espèces du genre rhizobia dont une (1) non rhizobia. Le genre Bradyrhizobium en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

**Classe: Beta Proeobacteria**

**Ordre: Burkholderiales**

**Famille: Burkholderiaceae**

**Genre: Burkholderia**

<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp.</i>
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp.</i>

Le genre Burkholderia contient actuellement sept membres nommés Rhizobia et d'

*Burkholderia* sp. Burkholderia en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016) autres

**Genre : Cupriavidus** *Aspalatus carnosa*

*C. taiwanensis* *Mimosa sp.*

Ce genre là contient actuellement une seule espèce rhizobia. Weir, B.S. (2016)

**Class: Gamma-Proteobacteria**

**Ordre: Pseudomonadales**

**Famille: Pseudomonaceae**

*Pseudomonas sp.* *Robinia pseudoacacia*

\*Des espèces avec une capacité de formation de nodules non décrites sont incluses de façon traditionnelle comme la bactérie du genre rhizobia.

### III- Etablissement de la symbiose rhizobienne

L'établissement de la symbiose est un phénomène complexe, qui se développe à travers une série d'événements et de transformations complexes et ordonnées.

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobiums. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable (Lerouge., *et al.*1990).

### **III-1-Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique**

Le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Ce processus est appelé nodulation. (Patriarca *et al.*, 2004) .

#### **III-1-1- Pré échange de signal d'infection et déclenchement du nodule**

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka *et al.*, 2002). En condition de carence en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (Dénarié., 2000).

Les facteurs Nod produits par des rhizobia différents partagent une structure chimique commune d'un lipochitoooligosaccharide (LCO). Un type de molécule qui a été détecté jusqu'à présent exclusivement chez les rhizobia (Debellé *et al.*, 2001).

#### **III-1-2-L'infection**

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen., 2002). Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de Rhizobia, la rhicadhésine est une protéine qui lie le calcium. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry *et al.*, 2004).

Lors de ce stade de la nodulation, la bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemma (Hopkins., 2003).

Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier., 2005). Le rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante (Bélanger., 1998).

L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine. Dès la reconnaissance du *Rhizobium* spécifique, des modifications structurales apparaissent dans les toutes premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologiques du poil absorbant : dépolarisations membranaires, modification de concentrations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, augmentation de pH et fragmentation de l'actine. Certains des poils absorbants infectés se courbent et forment une « crosse de berger » à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient (Duhoux *et al.*, 2004).

En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi; et ainsi facilite la pénétration des bactéries (Dupuy et Nougier., 2005). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance) (Pelmont., 2005).

### **III-1-3-Développement du nodule et libération des bactéries**

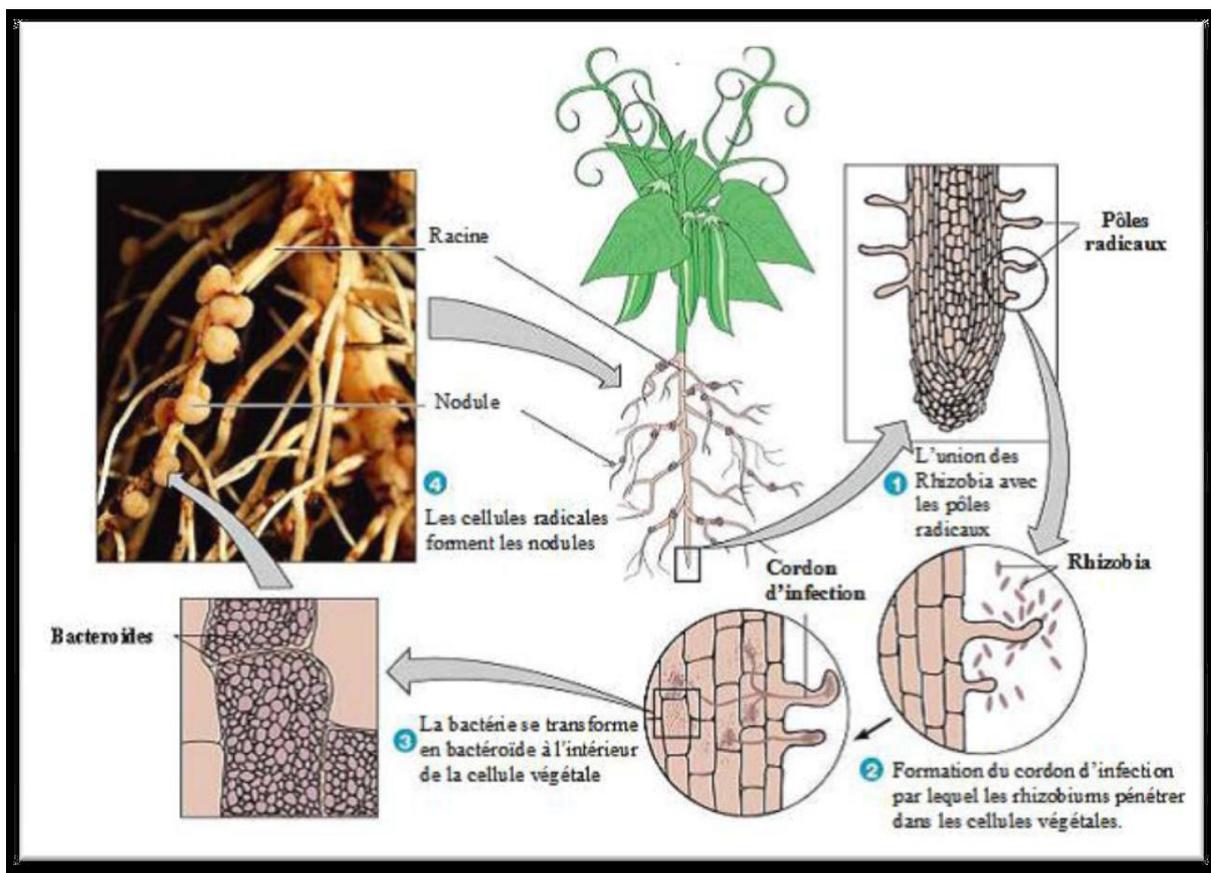
Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins *et al.*, 2003). Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte (Raven *et al.*, 2007). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone 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).

En cours de développement de nodule, les bactéries subissent des changements morphologiques et physiologiques qui mènent à la formation des bactéroïdes (Fenton ., 1994).

Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane, nommée membrane pér bactéroïdienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses modifications métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont

l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale: la fixation d'azote (Hopkins *et al.*, 2003).

La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004). Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux *et al.*, 2004).



**Figure 2 :** formation d'un nodule (Tortora *et al.*, 2003)

#### IV -La nodulation

En général, trois types de gènes symbiotiques interviennent dans le processus de nodulation et de fixation azotée chez la bactérie. Il s'agit des gènes *nod* incluant des gènes communs et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hcn*) (Broughton *et al.*, 2000 ; Spaink., 2000) , des gènes *nif* codant pour la nitrogénase et des gènes *fix* indispensables pour la fixation de l'azote.

Chez la plupart des rhizobia (*Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* etc.) ces gènes symbiotiques sont situés sur un grand plasmide symbiotique appelé pSym (Mercado-Blanco et Toro, 1996 ; Noel., 2009).

#### **IV-1-Les gènes *nod***

Gènes nécessaire à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodistés. Les gènes *nod* ou gène de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier., 2005).

Il est le premier gène *nod* transcrit. Sa transcription se fait de manière constitutive (Geurts et Bisseling, 2002)

Trois gènes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC*) sont des gènes de nodulation communs à tous les *Rhizobiums*; ils codent pour le squelette chimio-oligosaccharidique des facteurs Nod (Werner, 1992).

Une autre série de gènes de spécificité d'hôte. *nod E*, *F*, *H*, codent pour la décoration (Hopkins, 2003).

#### **IV-2 -Les gènes *nif***

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens, sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

La synthèse du complexe enzymatique la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif*. Deux gènes *nif* : *nifD* et *nifK*, codent respectivement pour les deux sous-unités de la protéine MoFe, la protéine Fe et la ferrédoxine sont codées respectivement par les gènes *nif H* et *nif F* (Fisher., 1994; Newton., 2007)

#### **IV -3-Les gènes *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 produits des gènes *fix ABCX* sont impliqués dans le transfert des électrons à la nitrogénase chez les rhizobia. Ces produits sont des flavoprotéines, alors que les gènes *fix N, O, Q, P* codent pour le cytochrome oxydase, et *fix G, H, I, S* codent pour la pompe cationique impliquée dans le processus d'oxydoréduction dans le complexe membranaire (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses (Dénarié., 2000). Ce transfert latéral des gènes de nodulations a contribué à l'évolution et à l'étendue de la capacité symbiotique (Moulin *et al.*, 2004).

#### **IV-4-Les gènes de la plante hôte**

Ce sont des gènes spécifiques qui codent pour les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités et les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la leghémoglobine, ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones et des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier., 2005). Ces nodulines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins., 2003).

Les facteurs Nod secrétés par les bactéries à la suite d'une reconnaissance mutuelle des flavones, induisent une voie de signalisation déclenchant différentes réponses sur la racine de la plante hôte, parmi lesquelles des oscillations périodiques de la concentration en calcium au niveau des poils absorbants (Dénarié *et al.*, 2004).

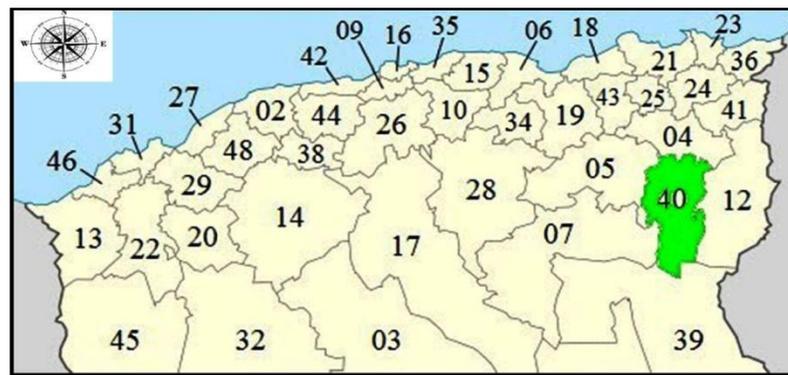
# Chapitre 2

## Matériels et méthodes

## I- Isolement des bactéries nodulants le Fenugrec (*Trigonella gladiata* Stev.)

Les nodules ont été prélevés à partir des racines de la plante *Trigonella gladiata* Stev. qui a été située dans la région de l'Est algérien.

L'échantillon est situé dans la région de Trachet commune d'El Mahmel (latitude 35.15502°N et longitude 7.28839°E) wilaya de Khenchela.



**Carte 1:** Localisation géographique de la zone de prélèvement

### I-1-Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars quand la terre est sèche, à cette période de l'année les nodules sont bien développés et sont visibles au niveau des racines.

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, se débarrasser de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules.

Placer délicatement la plante avec la partie racinaire dans un sachet en plastique pour le transporté.

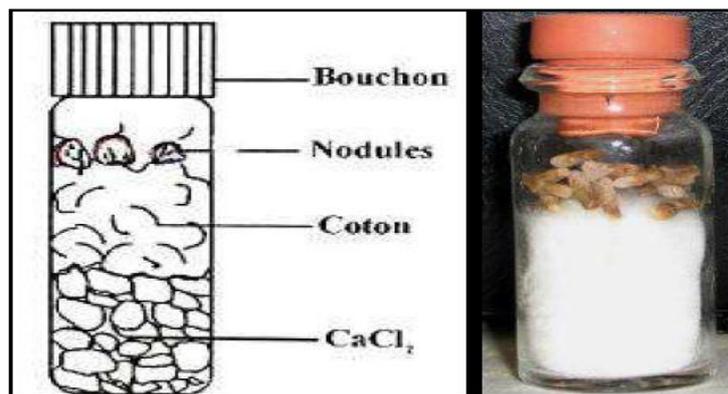
Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau, les nodules doivent être détachés à 1 ou 2 mm du site d'attache, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables de bactéries. Rincer les nodules, puis les sécher avec du papier absorbant avant leur conservation.

### I-2 -Conservation des nodules

Pour une courte conservation et une utilisation immédiate, Les nodules frais sont mis dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace). Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur qui est le chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$  absorbe l'humidité et empêche la croissance des champignons et des autres bactéries) (Vincent., 1970). Qui consiste à remplir la moitié des flacons en verre par du  $\text{CaCl}_2$ . Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules. Sur chaque flacon sont mentionnées les informations suivantes :

- le nom latin de la plante (genre et espèce).
- la date et le lieu de collecte.
- La date de conservation.

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



**Figure 3 :** Conservation des nodules (Vincent, 1970).

### I-3-Isolement des souches à partir des nodules

Les différentes étapes d'isolement des *Rhizobium* sont celles décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994). Dans les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles conservés par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans de l'eau pendant 24heurs au réfrigérateur à 4°C, puis pendant 1h à température ambiante.

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

La stérilisation s'effectue sous la hotte à flux laminaire (Kottermann) selon les étapes suivantes:

- Les nodules intacts sont immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis avec de l'hypochlorite de sodium 3% (NaClO 3%) pendant 3 minutes.

-En suite les nodules sont rincés 10 fois par de l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

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

### **I -3-2 Test de stérilité**

Prendre le nodule stérile et l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA+ Rouge Congo, puis l'incuber à 28°C pendant 48h à 72h, et cela pour vérifier l'efficacité de la technique de stérilisation utilisée et la stérilité externe des nodules.

### **I-3-3-Ecrasement des nodules**

Les nodules stériles sont déposés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri.

Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.

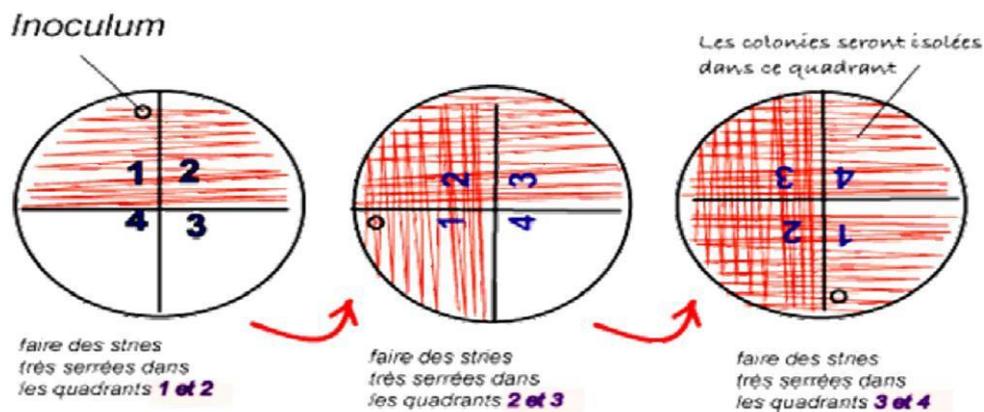
### **I-3-4-Isolement des souches**

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

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu YMA (Vincent, 1970) additionné de rouge Congo (**Annexe 1**).L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans avec flambage de l'anse de platine après chaque ensemencement, de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser.

Les mêmes nodules sont ensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA au BCP) (**Annexe 1**). Les boîtes sont incubées trois jours à 28°C.

Toute cette manipulation doit être effectuée sous des conditions microbiologiquement contrôlé, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen, sous une hotte à flux laminaire.



**Figure4** : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

## II- Caractères cultureux

### II-1- Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. (**Annex1**).

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

- Milieu liquide: YMB (Yeast Mannitol Broth)
- Milieux solides: YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

## II-2-Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent., 1970 ; Somasegaran et Hoben., 1994) des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant l'YMB (**Annexe 1**) puis incubées à 28°C. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC et GPA+BCP.

## II-3 -Vitesse de croissance

Les bactéries nodulants les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, ...). Pour cela on cultive nos isolats et la souche de référence sur milieu YMA + bleu de bromothymol (**Annexe 1**). L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).

## II-4-Examens microscopiques et macroscopiques

### II-4-1- Examens microscopiques

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupe Gram positif et Gram négatif (Tortora., 2003). (**Annexe 2**)

### II-4-2 Teste de mobilité :

Par une anse de platine contient une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incubé à 28°C pendant 72 heures et observé.

## II-5-Conservation des isolats

Après la vérification de leur pureté, les souches utilisées dans notre étude sont ensemencés sur des tubes inclinés et boîtes de Pétri contenant le milieu YMA (**Annexe 1**) additionné de CaCO<sub>3</sub> (2g/l) comme agent neutralisant de l'acidité, incubé à 28°C pendant 3 jours.

Après incubation, les tubes et les boîtes sont conservés à 4°C. Cette méthode permet une conservation des souches pendant 6 à 12 mois (Vincent., 1970).

**Tableau 2:** souches utilisées dans cette étude

Code des souche	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Source
N1C1	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
N1C2	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
N2C3	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
N3C4	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
N4C5	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
N4C6	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
N4C7	Isolat	<i>Trigonella</i>	Khenchela Algérie	Notre étude
R08	<i>Rhizobium nepotum</i>	<i>Rhizobium</i>	Eltarf Algérie	Mellal Hanene

### III- Caractérisation phénotypique des isolats

#### III-1-Tests nutritionnels

##### III-1-1-Utilisation de la source de carbone

Les besoins nutritionnels sont évalués en cultivant les souches sur le milieu YMA où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Xylose, Arabinose, Galactose, Saccharose, Glucose, Sorbitol, Lactose, Maltose. Et réduire la quantité de l'extrait de levure à 0.05g/l. Incubés à 28°C pendant 48 heures.

### **III-1-2- Utilisation de la source d'azote**

Pour la source d'azote, les souches sont cultivées sur le milieu défini 8 (Vincent., 1970). où le glutamate de sodium est remplacé par différents acides aminés suivants: Leucine, proline, Thréonine, Lysine, Glycine, Histidine, Asparagine, Glutamate, Tryptophane. Incubés à 28 °C pendant 48 heures.

### **III-2-Tests biochimique**

#### **III-2-1-Réduction des nitrates**

Les souches sont cultivées sur le bouillon TY (Beringer., 1974) (**Annex1**) contenant 0.1% de KNO<sub>3</sub> (p/v), et incubés pendant 4 jours à 28°C.

Après la période d'incubation, 3 à 4 gouttes des réactifs I et II du nitrate réductase ont été ajoutés au milieu.

L'apparition d'une coloration rouge ou rose indique que les nitrates sont réduits en nitrites (nitrate réductase+.)

Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de poudre de zinc et observer après quelques minutes la teinte obtenue. (La couleur rouge signifie la non réduction des nitrates, alors que un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche à le nitrate réductase).

#### **III-2-2-Hydrolyse de l'urée**

L'urée est un composé organique considéré comme une source unique de l'azote aux bactéries possédant une uréase. En présence de cette enzyme les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en ammonium qui conduit à une alcalinisation du milieu de culture (Delarass., 2007 ; lanotte *et al.*, 2007). Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et souches témoins sont cultivées sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH 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 alcalinisant ou acidifiant le milieu.

### III-2-3-Activité cellulolytique

L'enzyme carboxy-méthyl-cellulase appelée aussi  $\beta$ -1,4-D-glucanase ou CMCase c'est une enzyme qui joue un rôle dans la nodulation et la phase initial du processus d'infection (Bhat et Bhat, 1997 ; Hu *et al.*, 2009) .Les souches sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% de CMC (Carboxy Méthyl Cellulose) pendant 5jours. Après incubation à 28°C, les boites sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 28°C. La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M ; les boites sont laissées 30mn à température ambiante puis vidées. Un halo jaune orangé entoure les colonies qui montrent une présence de l'enzyme.

### III-2-4-Activité pectinolytique (Struffi., *et al* 1998)

Les souches bactérienne sont cultivées sur milieu YMA où le mannitol est remplacé par l'Inositol 0,1% et additionné de 0,2% de pectine, puis sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

Après incubation, les boites sont rincées délicatement avec l'eau courante puis inondées avec une solution de rouge de ruthénium 0,05 % pendant 30mn.

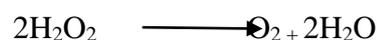
Un halo décoloré autour des colonies indique une activité polygalacturonasique.

### III-2-5-Recherche de l'oxydase

L'activité oxydase a été déterminée par la méthode des disques d'oxydases. A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée on dépose une colonie sur le disque. La réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette.

### III-2-6-Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), selon la réaction suivante:



Elle est mise en évidence par contact de la culture bactérienne avec une solution d'eau oxygénée.

Pour chaque souche une goutte d'eau oxygénée est place sur une lame stérile sur laquelle quelques colonies sont réparties.

Un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles d'air traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de catalase (Joffin J.N., et Leyral G., 2006).

### **III-3-Tests physiologiques**

#### **III-3-1-Tolérance au NaCl**

Pour tester la tolérance de nos isolats et la souche de référence, nous avons inoculé le bouillon TY avec différentes concentrations de NaCl (1%, 2%, 3%, 5%, 10%) (p/v). (85.5mM, 171mM, 342mM, 513mM, 1710mM).

Incubés à 28°C puis on mesure la DO à 600nm (après 24h et après 48h).

#### **III-3-2-Effet de la température**

Dans le but d'estimer les températures maximales et optimales de croissance, les souches sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C.

#### **III-3-3-Effet du pH**

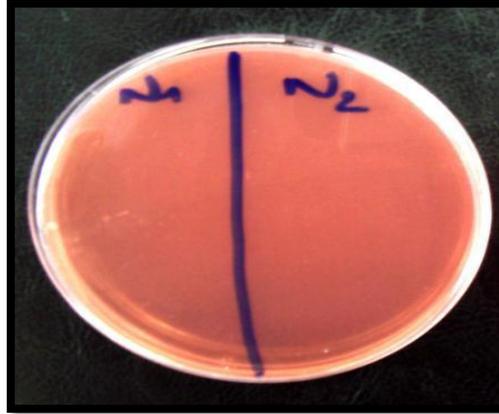
On vaensemencer des bouillons YMB ajustés à des différents pH (3,4,5, 6,8, 8, 9, 10), Incubés à 28°C puis on mesure la DO à 600nm (après 24h et après 48h).

# Chapitre 3

## Résultats et discussion

## I -Test de stérilité

Ce test permet de vérifier l'efficacité de la technique utilisée pour la stérilisation des nodules, et ceci se manifestera par l'absence de croissance des bactéries sur le milieu YMA+RC (**Figure 5**).



**Figure 5** : Test de stérilisation

## II -Caractères cultureux

### II -1-Croissance sur milieu YMA+rouge Congo

Sur le milieu YMA+RC, les isolats n'absorbent pas le rouge de Congo et restent ainsi blanches rarement roses (**Figure 6**), ces résultats ont été observés chez la majorité des *Rhizobia* étudiés par Vincent (1970) et Jordan (1984)

La plupart des rhizobia n'absorbe pas ou très peu le colorant de rouge Congo sur le milieu YMA ce qui permet de distinguer les espèces contaminantes colorées en rouge (Sadowsky *et al.* 1983; Somasegaran et Hoben 1985).



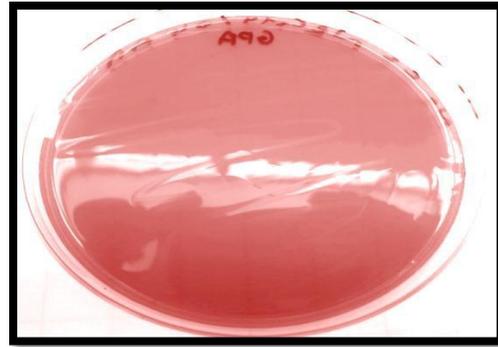
**Figure 6**: croissance de l'isolat sur le milieu YMA+RC

## II -2- Croissance sur le milieu GPA +BCP

Après 72h d'incubation, sur le milieu GPA on a observé chez l'isolat N1C1 un virage de couleur vers le jaune indique une acidification (**Figure 7a**), alors que les autres isolats n'ont montré aucune croissance et sans changement de couleur (généralement ce milieu est utilisé pour le contrôle de la pureté des isolats) (**Figure 7b**)



**Figure 7a:** Acidification de milieu GPA+BCP

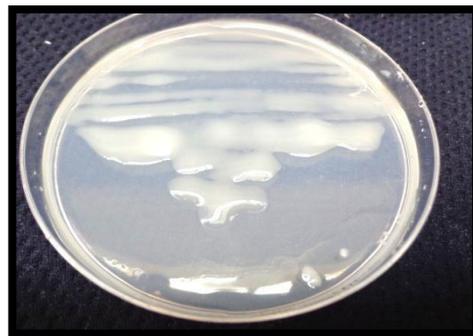


**Figure 7b:** absence de croissance sur le GPA+BCP

## II -3- Croissance sur le milieu YMA

Au bout de 48-72h d'incubation à 28°C sur le milieu YMA, la croissance donne des colonies circulaires, bombées avec un diamètre de 2 à 4 mm, de couleur blanchâtre à crème, lisse, brillante avec une texture translucide homogène (**Figure 8**).

Cette description est valable pour la grande majorité des colonies, et ceci correspond à la description des rhizobia par Jordan (1984).



**Figure 8:** croissances des isolats sur milieu YMA

## II-4- La vitesse de 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 la coloration du BTB vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali., 2006).

Après 24h d'incubation, Tous nos isolats modifient partiellement le pH sur le milieu YMA+BTB, mais après 48h les souches acidifient totalement le milieu dans les boîtes (virage au jaune) (**Figure 9**).

La couleur jaune reflétant la croissance rapide des souches est pour certains auteurs (El-Hillali., 2006) obtenue au bout de 24h, pour d'autres (Pinto *et al.*, 2007) au bout de 3 à 5 jours, ce qui confirme la croissance rapide de nos isolats.



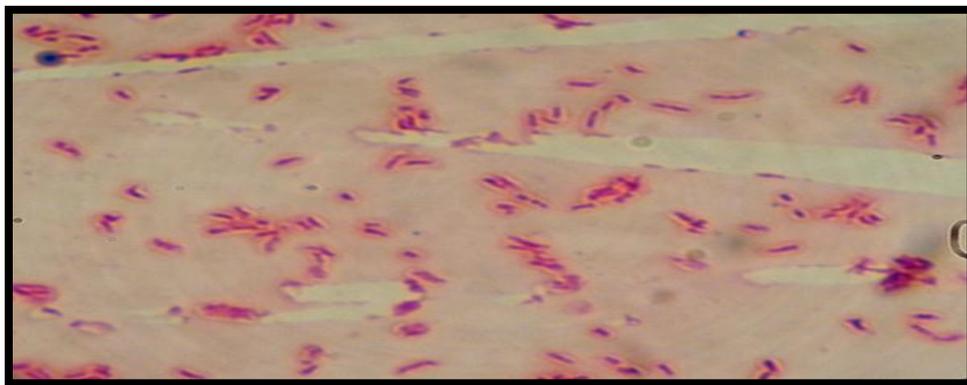
**Figure 9:** Acidification du milieu YMA+BTB

### III - Caractères microscopique et macroscopique

#### III- 1-Caractères microscopique

L'observation microscopique de coloration de Gram à révéler que l'ensemble des isolats testés sont des bacilles courts bien isolés de couleur rose, à Gram négatif (**Figure 10**).

Les rhizobia sont des bactéries du sol, bacilles Gram négatives, strictement aérobies et non sporulant, possédant une forme de bâtonnets (Jordan 1884)

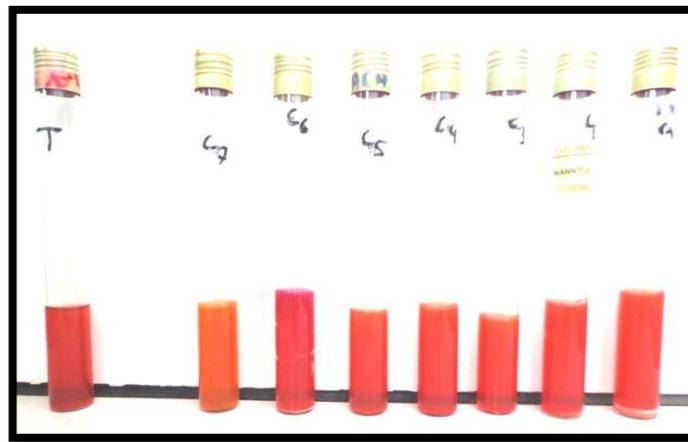


**Figure 10:** Observation microscopique d'un isolat (objectif x 100) après coloration de Gram

### III -2-Teste de Mobilité

Après incubation tous les isolats donnent un résultat positif (Mannitol+), confirme que les souches isolées sont mobiles (présence d'un voile) et capables de fermenter le mannitol rendent le pH acid (acidification du milieu et production importante du gaz apparaît) (**Figure 11**).

Les rhizobia ne forment pas d'endospores, mobiles par des flagelles polaires ou péritriches (4 à 6), aérobies, chimioorganotrophes, ils deviennent pléomorphes dans des conditions adwerses (Prescott *et al.*, 2007).



**Figure 11:** Résultat de Mannitol mobilité

Les résultats trouvés selon l'étude des caractéristiques morphologiques, culturelles et microscopiques sont en concordance avec ceux observés par Vincent (1970), Jordan (1984), Rodriguez *et al.*, (1987) ; Beck *et al.*, (1993) ; Somasegaran et Hoben (1994). Chez les rhizobia.

## IV - Caractérisation phénotypique des bactéries

### IV -1-Teste nutritionnels

#### IV -1-1-Utilisation des sucres comme source de carbone

Les résultats obtenus montrent que les souches utilisent tous les sucres testés comme seul source de carbone mais avec une différenciation entre l'un et l'autre.

En présence de l'un des sucres suivante : Saccharose, Mannitol, Maltose, et Sorbitol, les isolats ont eu une très bonne croissance par contre il y a des sucres moins assimilés par les souches comme le Lactose, le Glucose et le Galactose.

La majorité des souches ne pousse pas en présence de : Xylose sauf la souche de référence R08 et l'Arabinose sauf les souches N2C3, N3C4 et souche de référence R08 (**Tableau 3**).

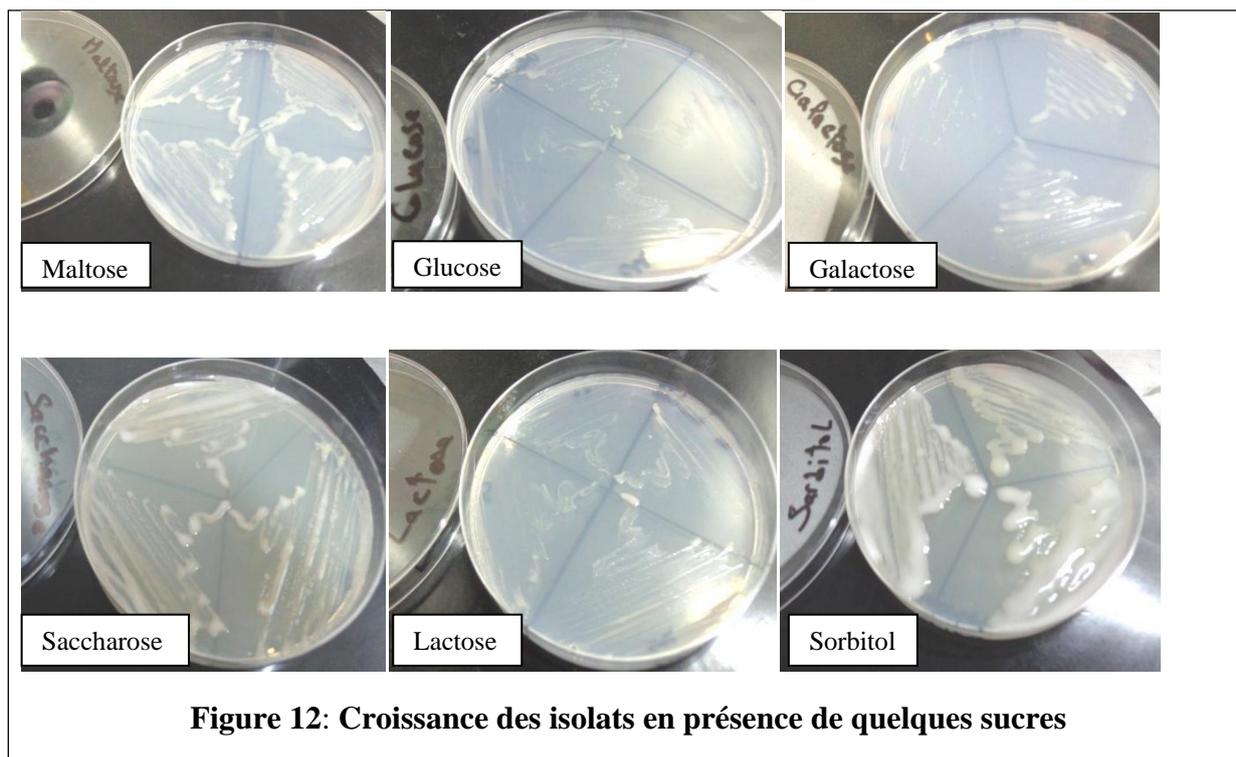
Kumari *et al.*, (2008) montrent que parmi les 20 carbohydrates testés, les monosaccharides (glucose, galactose, arabinose, fructose, raffinose et xylose) donnent une bonne croissance, suivie par le mannitol, les disaccharides (lactose, maltose, saccharose) et les polysaccharides (cellulose).

Cigdem *et al.*, (2006) montrent que les rhizobia isolés à partir des nodules de *Phaseolus vulgaris* sont capable de croître en présence du glucose, galactose, mannitol, sucrose, succinate, rhamnose et mannose.

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

	Arabinose	Maltose	Xylose	Glucose	Galactose	Saccharose	Lactose	Sorbitol	Mannitol
N1C1	-	+++	-	++	++	+++	++	+++	+++
N1C2	-	+++	-	++	++	+++	++	+++	+++
N2C3	±	+++	-	++	++	+++	++	+++	+++
N3C4	±	+++	-	++	++	+++	++	+++	+++
N4C5	-	+++	-	++	++	+++	++	+++	+++
N4C6	-	+++	-	++	++	+++	++	+++	+++
N4C7	-	+++	-	++	+	+++	++	+++	+++
R08	+	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++

(+++):Très bonne croissance (++)Bonne croissance (+):croissance moyenne (±):Faible croissance (-):pas de croissance



#### IV -1-2-Utilisation des acides aminés comme source d'azote

La croissance des isolats et souche de référence sur le milieu YMA est variable selon la source d'azote et l'acide aminé additionné. (**Tableau 4**)

Les souches peuvent pousser en présence de la plupart des acides aminés comme source d'azote.

Toutes les souches assimilent beaucoup mieux l'histidine, le proline, le glutamate, l'asparagine et la leucine que le reste des aminoacides. Ces acides aminés sont classés biochimiquement parmi les acides aminés essentiels.

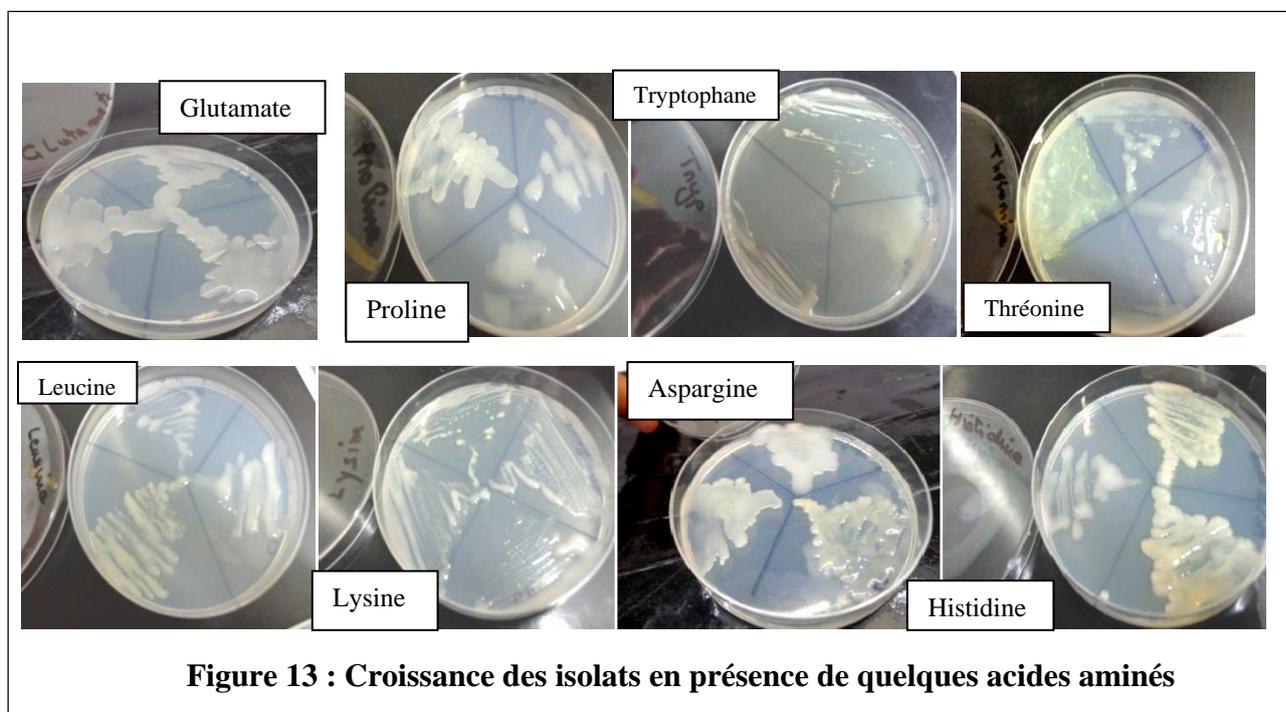
Ces résultats sont en concordance avec ceux de Squatrini *et al.*, (2002) dans la description des *Rhizobium sulae* que le glutamate, la valine, la proline, l'isoleucine, l'arginine et l'asparagine sont tous utilisés comme source d'azote.

le mécanisme d'adaptation des rhizobiums aux stress abiotiques résulte soit de l'absorption des osmoprotecteurs (glycine, bétaïne, proline, glutamate ...) à partir du milieu environnement, soit à la stimulation de la biosynthèse de ces composés (Vriezen *et al.*, 2007).

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

	Glutamate	Proline	Tryptophane	Thréonine	Leucine	Lysine	Glycine	Asparagine	Histidine
N1C1	+++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	+++
N1C2	+++	+++	±	+++	++	+++	+	+++	+++
N2C3	+++	+++	+	+	+++	±	+	+++	+++
N3C4	+++	+++	±	+++	+++	+++	+	+++	+++
N4C5	+++	+++	+	++	+++	+	±	+++	+++
N4C6	+++	+++	±	++	+++	++	±	+++	+++
N4C7	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
R08	+++	+++	+++	+++	++	+	±	++	+++

(+++):Très bonne croissance (++) : Bonne croissance (+):croissance moyenne (±) : Faible croissance



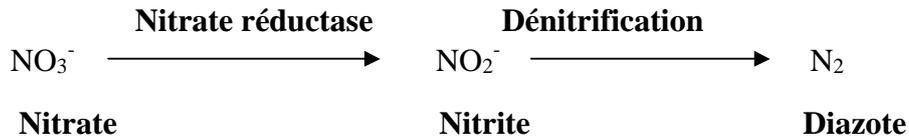
**Figure 13 : Croissance des isolats en présence de quelques acides aminés**

## IV -2- Tests biochimiques

### IV -2-1-Réduction des nitrates

Après l'addition des réactif nitrate I et II à la culture bactérienne, les souches N3C4et N4C7donnent une couleur rouge ce qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites, par contre les souches N1C1, N1C2, N2C3, N4C5, N4C6 donnent une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc apparaît incolore (milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche à le nitrate réductase) (**Figure 14**).

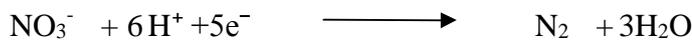
Ces résultats montrent que tous nos souches testées réduisent les nitrates en nitrites, suite à une activité de l'enzyme nitrate-réductase qui catalyse la réaction suivante:



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon :



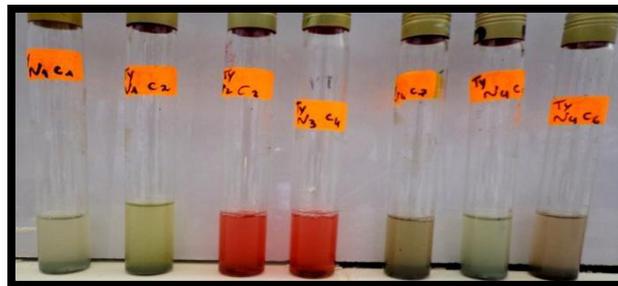
La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon :



Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (El-Hilali., 2006).

Lucinski *et al.*, (2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les *Rhizobia* dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes.

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin et Leyval., 2006).



**Figure14** : réduction de nitrate positif (+)

#### IV -2-2-Hydrolyse de l'urée

Toutes les souches ont une activité uréasique positive et alcalinisent le milieu en observant un virage de la couleur de l'indicateur de pH du rouge vers le rose après 48h d'incubation (**Figure 15**), ceci indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme dans l'équation suivante (Guiraud., 1998) :



Les microorganismes possèdent une uréase très active transforme l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium, c'est une transformation très importante dans le monde agricole (Mobely., 1992 et Guiraud., 1998).

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



**Figure 15 : uréase positif**

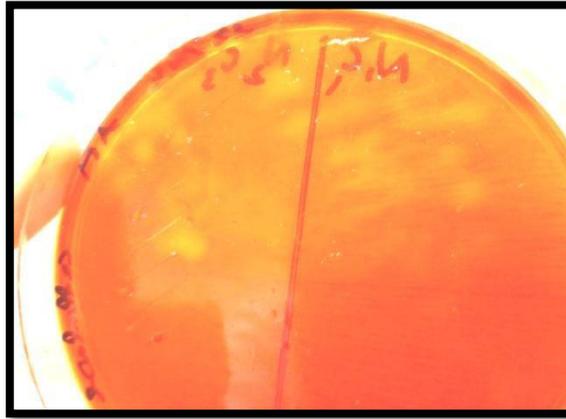
#### **IV -2-3-Activité cellulosique**

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la Cellulose, l'apparition d'un halo jaune orange autour des colonies indique la présence D'une endoglucanase (cellulase) Tous nos isolats ont montré une activité cellulolytique (**Figure16**).

Les résultats obtenus pour cette étude sont en concordance avec ceux de Baumberger *et al.*, (2002) ont confirmé que l'activité de la cellulase est trouvées chez plusieurs espèces rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *B.japonicum*, et les différentes souches du *R. Leguminosarum*.

Deux iso-enzymes CMCase de structure et de poids moléculaire différents sont déterminés par Hu et Lin (2003) produits par la souche *Sinorhizobium fredii* CCRC 15769.

Le *Rhizobium* produisent l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidique de la paroi cellulaire des cellules végétales, ce qui facilité la pénétration des *rhizobia* à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992.)



**Figure 16:**Test de cellulase positif

#### IV -2-4-Activité pectinolytique

Après l'addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec de l'eau un halo clair est observé autour des colonies indiquant une activité pectinolytique pour toutes les souches (**Figure17**).

Rathore *et al.*, (2009) déclare que les bactéries isolées à partir des nodules des plantes légumineuses *Puraria tuberosa* et *Mucuna pruriens* possèdent une activité pectinolytique.

Un événement central dans le processus infectieux de la symbiose *Rhizobium*–légumineuse est la modification de la paroi cellulaire de la cellule-hôte formant une porte d'entrée assez large pour la pénétration bactérienne (Mateos *et al.*, 2001 et Baumberger *et al.*, 2002).

Struffi *et al.*, (1998) ont prouvé la production des deux enzymes : endoglucanase et polygalactoranase, dégradant les ponts glucidiques de la paroi cellulaire par les espèces du *Rhizobium sulae*.



**Figure 17:** Test de Pectinase positif

#### IV -2-5-Recherche d'oxydase et de la catalase

Tous nos isolats étudiés sont oxydase et catalase positifs à l'exception de la souche de référence qui a un catalase négatif. (**Tableau 5**)

Le *Rhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobie (Werner., 1992 et Benguedouar., 2000).

**Tableau 5** : résultats de test d'oxydase et la catalase

Les souches	Oxydase	catalase
N1C1	+	+
N1C2	+	+
N2C3	+	+
N3C4	+	+
N4C5	+	+
N4C6	+	+
N4C7	+	+
R08	+	-

(+) Résultat positif (-) Résultat négatif

#### IV -3-Tests physiologiques

##### IV -3-1-Tolérance au Chlorure de sodium

Il existe une très grande variabilité dans la tolérance des souches aux différentes concentrations de NaCl testées. (**Figure 18**)

Toutes les souches tolèrent des concentrations de NaCl de 1% jusqu'à 3% avec un optimum de croissance de 2% noté chez les souches N1C1, N4C6, N4C7 et souche de référence R08 et optimum de croissance 3% noté chez les souches N1C2, N4C6, alors que la croissance s'est révélée variable à partir de concentration 5%. La majorité des souches peuvent tolérer une concentration 10% de NaCl, cependant, sont inhibée à des concentrations élevé à cela.

Les résultats obtenus sont comparables à celles trouvés par Struffi *et al.*, 1998. En marque qu'une variation dans la tolérance des sels, au paravant été trouvée chez la pluparts des souches de *Rhizobium* (Raza *et al.*, 2001).

Raza *et al.* (2001) ont trouvé que toutes les souches de *Rhizobium* isolées à partir de lupin (*Lupinus albus*) de l'Egypte sont capables de résister jusqu'à 5% de NaCl (50g/L, 0,85M) tandis que ces mêmes souches ne poussent pas à 8% (80g/L, 1,36M).

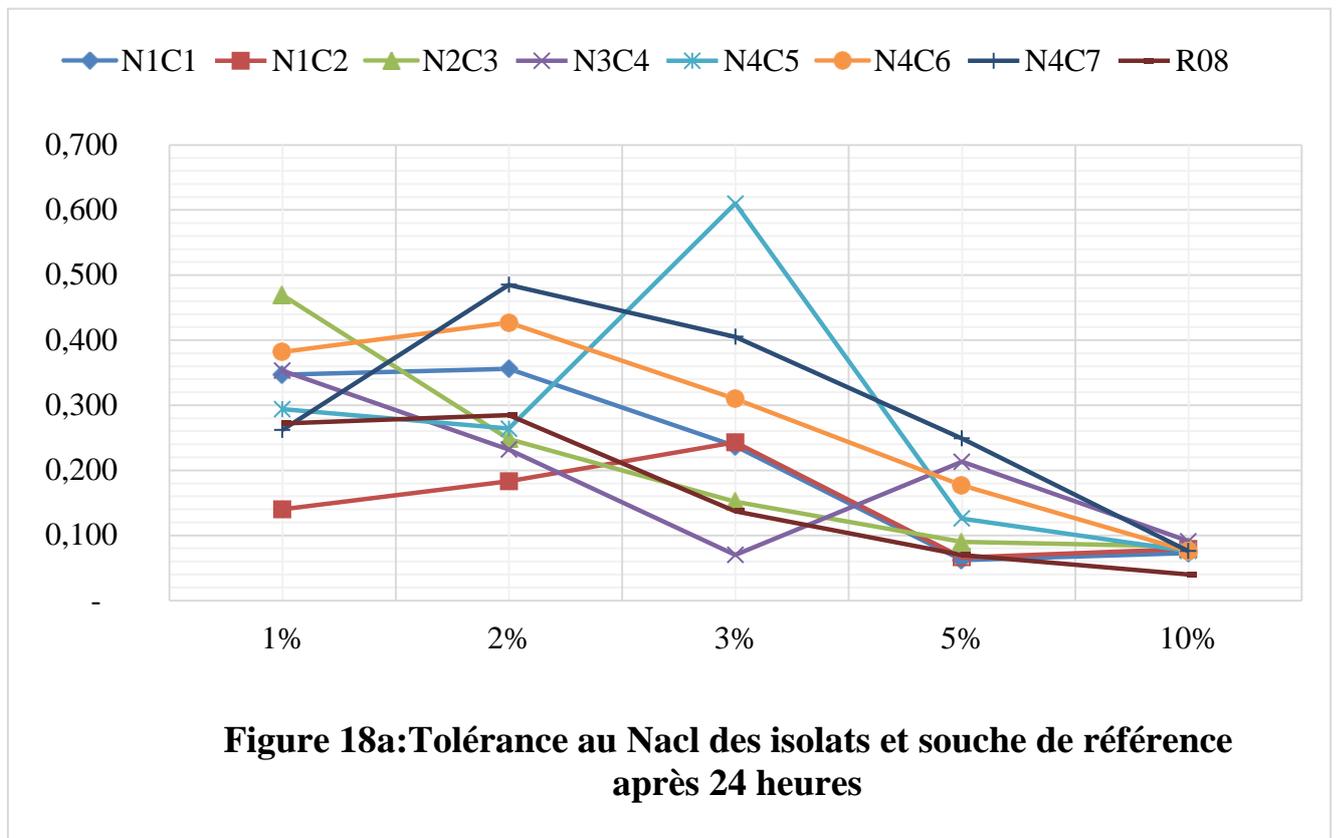
En général, Les effets du NaCl semblent être un bon indicateur de réponse des rhizobiums aux différents conditions de salinité (Diez *et al.*, 2009).

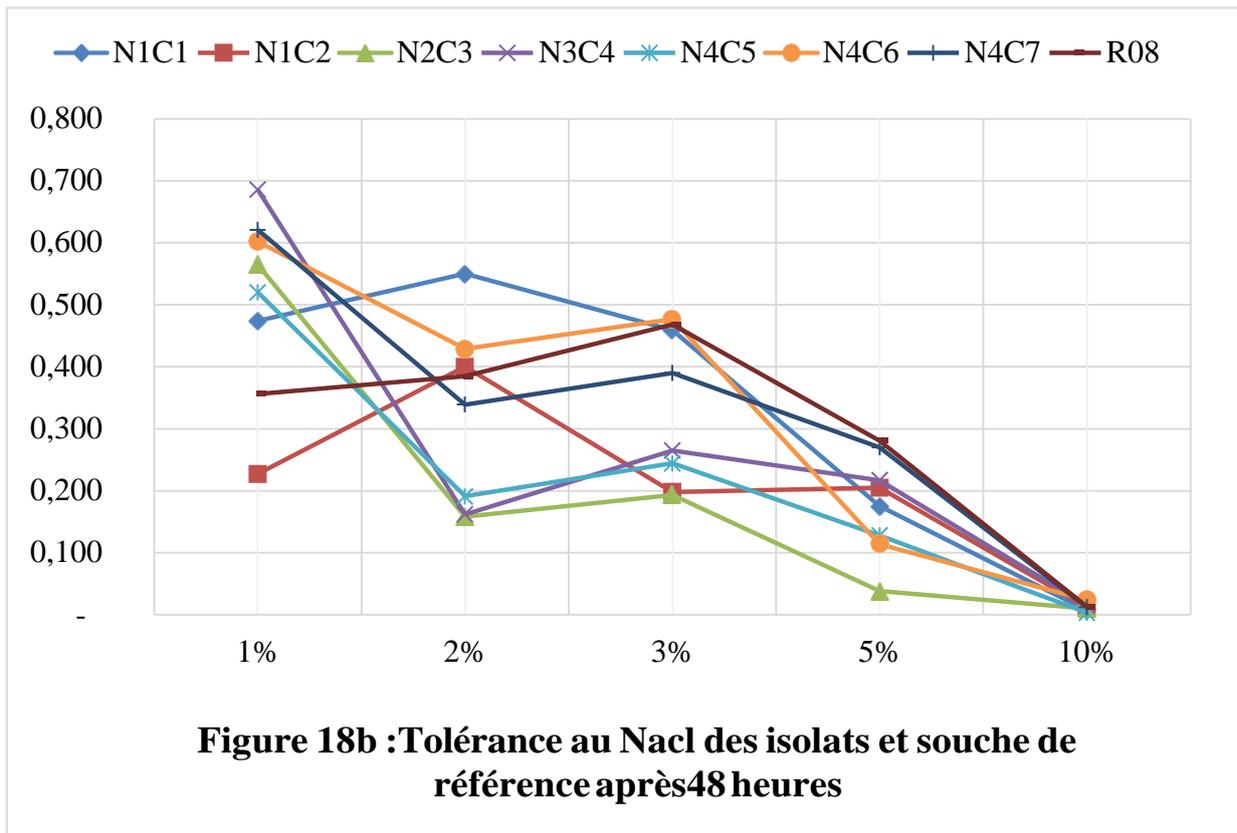
La symbiose légumineuses- *Rhizobium* et la formation des nodules sur les racines des plantes légumineuses sont plus sensibles au sel et au stress osmotique que leur rhizobia (Zahran., 1999).

La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah *et al.*, 2001).

Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobia s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran., 1999).

Thami-Alami *et al.*, (2010) montrent que les rhizobia à croissance rapide, sont plus tolérantes à la salinité que celles à croissance lente.





#### IV -3-2-Effet du pH sur la croissance des isolats

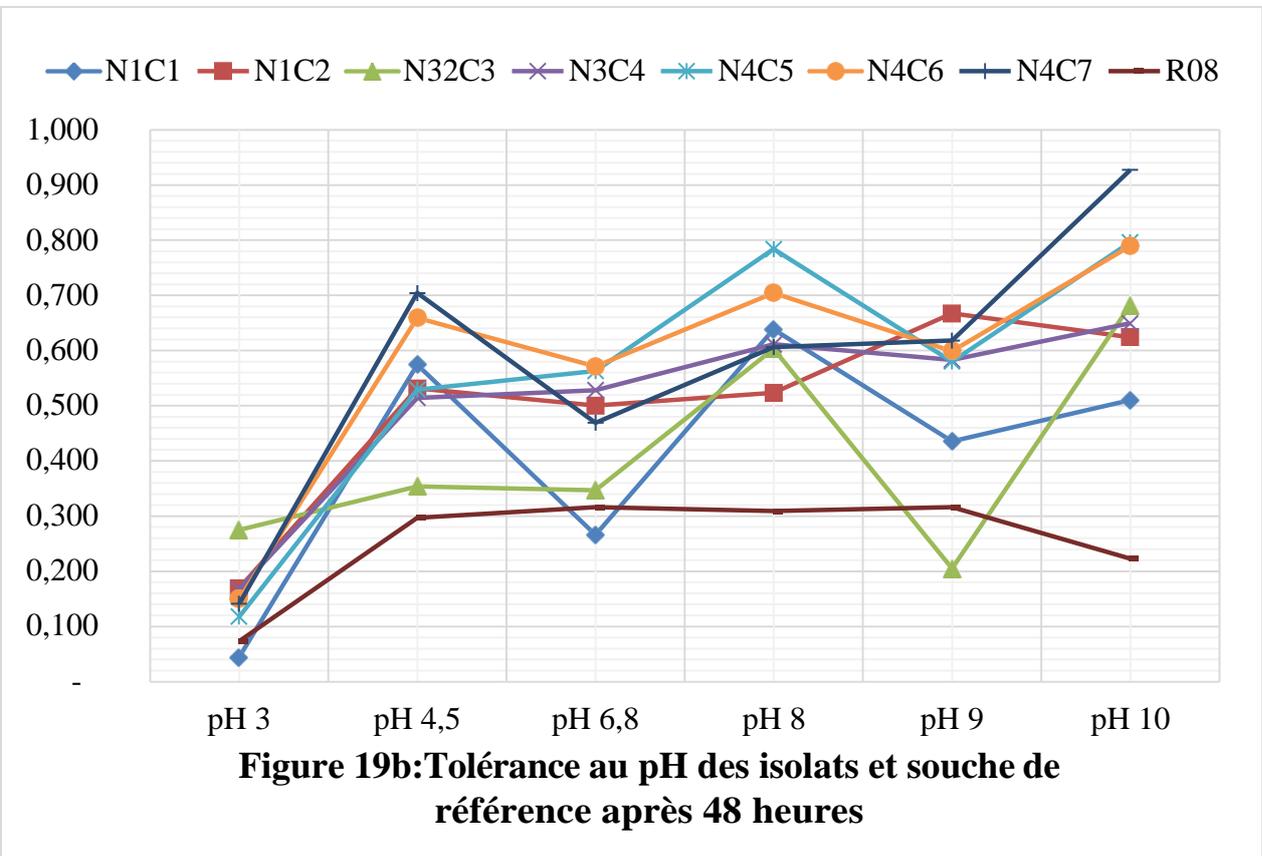
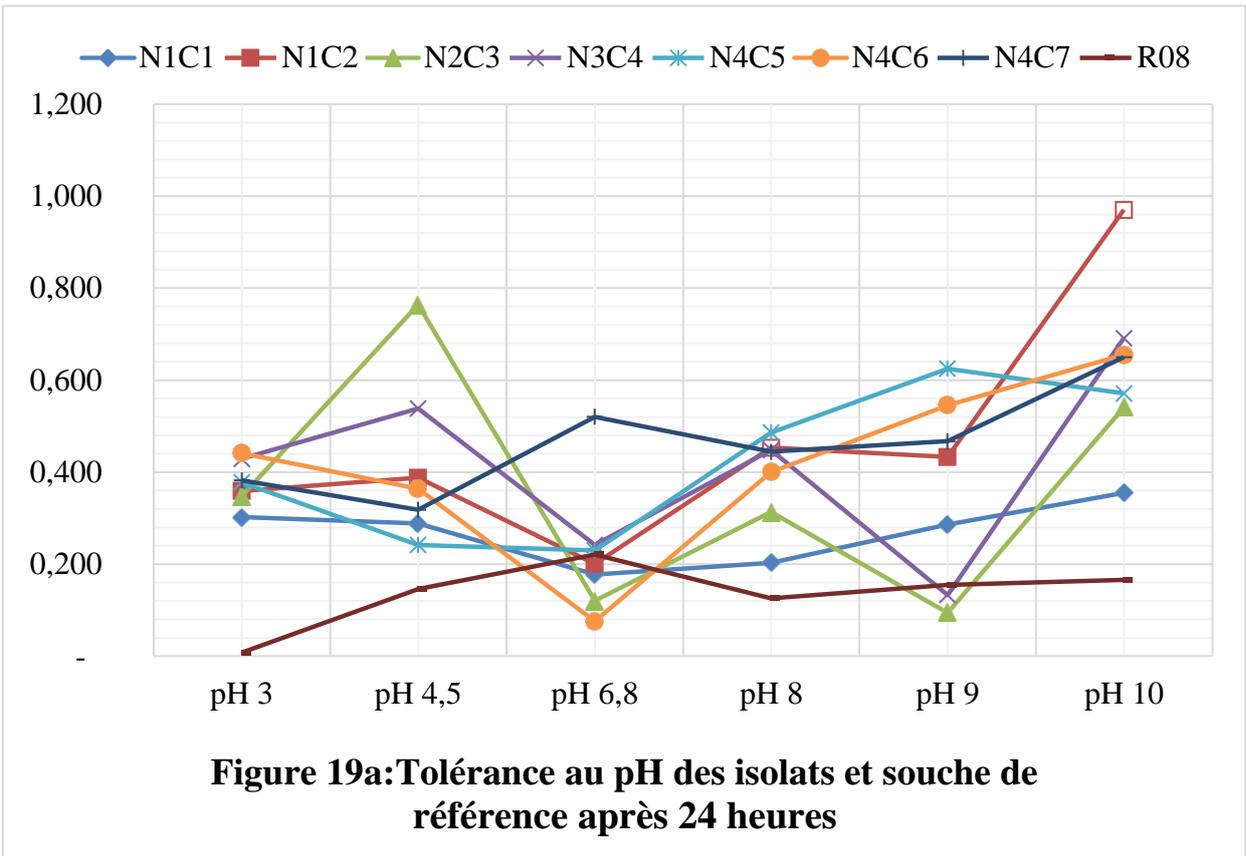
La mesure de la DO de la croissance des souches ensemencés sur le milieu YMB ajusté à différents pH a été effectuée après 24h et 48h d'incubation. (**Figure 19**)

Les résultats obtenus montrent que la majorité des souches testées sont capable de pousser entre pH 4.5 à pH 10 avec un optimum de croissance à pH 8 sauf la souche de référence R08.

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Maatallah *et al.*, (2002) qui ont détecté la croissance de leurs isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza *et al.*, (2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4 à 10).

Chen *et al.*, (1993) ont étudié la tolérance du *Rhizobium léguminosarum* ANU1173 au pH acide et ils ont trouvé que cette souche a pu pousser sur un pH de 4,5.

Maria José *et al.*, (2004) ont trouvé que le *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium sp.* sont capables de noduler l'*Alfalfa* à un pH de 5,6. Alors que l'étude de cinq souches de *Rhizobium sp.* de la région de Tlemcen, Lakhali *et al.*, (2008) ont remarqué que les cinq souches poussent à pH 9.



#### IV -3-3-Température de croissance

La capacité des souches isolées de *T. gladiata* à croître à différentes températures a été déterminée dans un intervalle allant de 4°C à 45°C.

Toutes les souches testées y compris la souche de référence montrent une croissance entre 4°C jusqu'à 45°C avec un optimum de croissance de 28°C à 37°C, Sauf quelques souches (N1C2, N4C5, N4C6, N4C7) qui continuent de croître même à 45°C. (**Tableau 6**).

Ces résultats en concordance avec celui El-Hilali (2006) a montré que la plupart des souches isolées des plantes de lupin peuvent croître à 4°C. Alors que Maatallah *et al.*, (2001) confirment que cinquante-six souches de *Rhizobium nodulans* de deux cultivars de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) poussent optimalement entre 30 à 35°C .

Pour la thermo-tolérance, elle est très variable parmi les espèces et les souches de rhizobia (Sebbane *et al.*, 2004). Abdelgadir et Alexander (1997) ont montré que le *Rhizobium leguminosarum Biovar phaseoli* peut survivre à 45°C. alors que beaucoup de Rhizobia de la plante *Prosopis cineraria* tolèrent des températures allant jusqu'à 55°C, et par exception d'autres isolats vivent dans une température de 65°C (Mahobia *et al.*, 2002).

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

Pour les rhizobia, la température affecte l'étape initiale de la nodulation ; la différenciation des bactéroïdes ; la structure et le fonctionnement des nodules (Zahran 2001; Priefer *et al.*, 2001 ; Cacciari *et al.*, 2003 ; Asadi Rahmani *et al.*, 2009 ; Thami-Alami *et al.*, 2010).

Vriezen *et al.*, (2007) rapportent une relation de la pression osmotique, la température et l'oxygène à la résistance des souches de *Rhizobium* à l'aridité, ce qui donne l'opportunité aux chercheurs de collectionner des souches résistantes au stress hydrique.

**Tableau 6** : Croissance des isolats à différentes températures

	4°C	20°C	28°C	30°C	37°C	45°C
N1C1	± (7jours)	++ (3jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	-
N1C2	+ (4jours)	++ (3jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	± (7jours)
N2C3	+ (4jours)	++ (4jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	-
N3C4	-	++ (4jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	-
N4C5	-	++ (4jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	± (7jours)
N4C6	± (7jours)	++ (4jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	+ (7jours)
N4C7	± (7jours)	++ (3jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (48h)	+ (7jours)
R08	+ (7jours)	++ (3jours)	++ (48h)	++ (48h)	++ (7jours)	+ (7jours)

(++):Bonne croissance (+):croissance moyenne (±):Faible croissance (-):pas de croissance

# Conclusion

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluantes et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote, a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote. En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose Rhizobia –légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

L'objectif principal de ce travail est une analyse phénotypique des isolats nodulants *Trigonella gladiata* Stev. récoltées de l'Est algérien (Khenchela), tout en suivant une démarche classique, celle appliquée par Vincent (1970, 1982), Somasegaran et Hoben (1994), Jordan (1984).

Cette recherche a permis de déceler d'une part les différentes caractéristiques d'intérêt fonctionnel des souches et leur diversité.

Les études phénotypiques, notamment la morphologie des colonies sur YMA, la vitesse de croissance, culture des souches sur milieux spécifiques, la présence d'enzymes spécifique au processus de nodulation, ... nous font croire que les isolats correspondent à une description du genre *Rhizobium*. A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées de la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. ont le même aspect morphologique que la souche de référence *Rhizobium nepotum*.

En effet nos isolats montrent qu'ils ont une croissance rapide sur le milieu BTB et n'absorbent pas le Rouge Congo. L'examen microscopique montre des bâtonnets à Gram négatif, mobiles sur le milieu du Mannitol mobilité.

La disponibilité des enzymes nécessaires dans le processus de nodulation et à l'hydrolyse des constituants de la paroi végétale est révélés (péctinase, cellulase), aussi les enzymes du métabolisme azoté (uréase, nitrate-réductase).

Toutes les souches y compris celle de référence sont douées d'une activité uréasique, polygalacturonique, cellulosique.

Le test nutritionnel dévoile que les isolats et la souche de référence ont tendance à utiliser une large gamme de carbohydrates comme source de carbone.

Nous avons évalué la tolérance de toutes les souches vis-à-vis des principaux facteurs de stress, en l'occurrence la salinité, le pH et les températures extrêmes. Une très importante osmotolérance est révélée pouvant aller jusqu'à 1710mM (10%) d' NaCl.

Les souches sont capables également de pousser sur une large gamme de pH allant de l'acidité pH 3 jusqu'à l'alcalinité pH 10.

Quant à la température, les souches peuvent croître dans les milieux froids 4°C, que dans les milieux chauds 45°C, avec une température optimale de croissance entre 28°C et 37°C.

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

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

- Une étude plus approfondie basée sur les méthodes moléculaires et nécessaire pour l'identification de nos isolats et pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi un tout autre genre des protéobactéries.

# Références

- Abdelgadir A.H et Alexander M., 1997** : Procedures to enhance heat resistance of *Rhizobium*. plant and soil. 188: pp 93-100.
- Acharya SN., Blade S., Mir Z., Moyer JS., 2007** : Tristar fenugreek. Canadian Journal of Plant Science. **87**: 901–903. DOI: 10.4141 : pp 06-047.
- Acharya SN., Thomas JE., Basu SK., 2006** : Fenugreek: An “old world” crop for the “new world” Biodiversity. **7**(3&4): pp 27–30. DOI: 10.1080/14888386.2006.9712808.
- Aggarwal B.B., et al ., 2006** : Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, *Biochem Pharmacol*, **14;71**(10): pp 1397-421.
- Ali L., Azad-Khan AK., Hassan Z., Mosihuzzaman M., Nahar N., Nasreen T., Nur-e-Alam M., Rokeya B., 1995** : Characterization of the hypoglycemic effects of *Trigonella foenum graecum* seed. *Planta Med.* **61** : pp 358-360.
- Amin A., 2005** : Chemopreventive activities of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) against breast cancer, *Cell Biol Int*, **29**(8): pp 687-94.
- Asadi Rahmani H., Saleh-rastim N., Khavazi K., Asghazadeh A., Fewer D., Kiani S., Lindström K., 2009** : Selection of thermotolerant bradyrhizobial strains for nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in semiarid regions of Iran. *World J. Microbiol Biotechnol.* **25**: pp 591-600.
- Basu SK., Acharya SN., Bandara MS., Friebel D., Thomas JE., 2009** : Effects of genotype and environment on seed and forage yield in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) grown in western Canada. *Australian Journal of Crop Science.* **3**(6): pp 305–314.
- Basu SK., Acharya SN., Thomas JE., 2007** : Colchicine treatment produces genetic improvement in fenugreek seed size and yield. *Graduates studies Association (GSA). Proceedings Multidisciplinary Graduate Research Conference.* **1**(1): pp 37–43.
- Basu SK., 2006** : Seed production technology for fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) in the Canadian (Master of Science thesis). Lethbridge, Alberta, Canada: Department of Biological Sciences University.
- Bhat M.K et Bhat S., 1997**: Cellulase degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotech. Advan.* **15**: pp 583-620
- Baumberger IC., Fraefel N., Göttfert M., Hennecke H., 2002** : New NodW- or NifA Regulated *Bradyrhizobium japonicum* Genes. *The American Phytopathological Society. MPMI* Vol. 16, No. 4, 2003, pp. 342–351.
- Beck DP., Materon LA., Afandi F., 1993** : Pratical *Rhizobium*-legume. Technical manual N°19.

- Beijerinck M., 1888** : Die Bacterien der papilionace enknollchen. Botanische Zeitung. 46: pp 797-804.
- Bélangier 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.
- Benguedouar A., 2000**: Etude de la symbiose *Rhizobium- Hedysarum coronarium* : essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium "hedysari"*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.
- Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A., Squartini A., 2004**: Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. System Appl Microbial. 27, pp 462-468.
- Beringer J.E., 1974** : R-Factor transfer in *Rhizobium* legum. J.Gen. Microbiol. 84 : pp 188-198.
- Berrada H., Fikri-Benbrahim K., 2014** : Taxonomy of rhizobia : Current perspectives. British Microbiology Research Journal.4(6) : pp 616-639.
- Broughton W.J., Jabbouri S., and Perret X., 2000** : Keys to symbiotic harmony. J. Bacteriol. 182, pp 5641-5652.
- Broughton W.J., 2000** : Interaction entre plantes et microorganismes. Cours de BMC.
- Bruneton J., 2009** : Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales.
- Burnie G., Forrester S., Greig D., Gust S., Harmony M., Hobluy S., et al., 2006** : Botanica Encyclopedie de botanique et d'horticulture. Edition Place des victoires. p 896.
- Cacciari I., Di Mattia E., Quatrini P., Moscatelli M.C., Grego S., Lippi D., De Paolis MR., 2003** : Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In: Grouzis M, Le Floch E (eds) Un arbre au désert, *Acacia raddiana*. IRD, Paris, pp 183–200.
- Cannon S., 2008** : Chapitre 3 : Legume comparative genetics.
- Chalck P.M., 1998** : Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: *a review*. Aust. J. Res. 49: pp 303-316.
- Chen H., Alan E., Richardson and Barry G. R., 1993**: Plant Microbe Interaction Group, Research School of Biological Sciences, Institute of Advanced Studies, Australian National University, GPO Box 475, Canberra City, Appl. Environ Microbiol. 59(6); pp 1798-1804.
- Cigdem K., Merith K., Engin K., 2006** : Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from bean. Turk. J. Boil. 30: pp 127-132.
- Cronk Q., Ojeda I., Pennington R.T., 2006** : Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Current Opinion in plant biology. 9, pp 99-103.

- Debelle F., Moulin L., Mangin B., Denarie J. and Boivin C., 2001** : Nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimia Polonia* Minireview, **48** (2), pp 359-365.
- De Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M.T., Lindström K., Dreyfus B., Gillis M., 1998** : Characterization Of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bactriole*. **48**: pp 369-382.
- Delarass C., 2007** : Milieux de culture et testés biochimiques pour l'identification bactérienne. In *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. TEC &DOC, EM inter. pp 126-172 .ISBN: 978-2-7430-0945-8
- Dénarié J., Debelle F., Rosenberg C., 2004** : Identification de deux gènes de légumineuse contrôlant des symbioses d'intérêt agronomique INRA, CNRS.
- Dénarié J., 2000** : Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- Diez B., Fajardo S., Puertas-Mejia M.A., del Rosario de Felipe M., et Fernandez-Pascual M., 2009** : Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol.* **191**, pp 35-46.
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G., 1999** : Les arbres fixateurs d'azote. Caractérisation fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Éditions espaces 34 (CRAD, FAO ; IRD).
- Doyle J.J., Luckow M.A., 2003** : The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a Phylogenetic context. *Plant Physiol.* **131**:900-910.
- Doyle J.J., 1994** : Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**:pp 325–349.
- Doyle JJ., 2011** : *Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation*. *Molecular Plant Microbe Interactions.* **24**: pp 1289–1295.
- Duhoux E., Nicole M., 2004** : Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France, pp 1- 20.
- 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. Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

- FAO., 2006** : Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques, INRAA. FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).
- Fazli FRY., 1967** : Studies in steroid-yielding plants of the genus *Trigonella* (PhD dissertation) England: University of Nottingham.
- Fenton M., 1994** : The expression in soil bacteria of symbiotic genes from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Dept of Microbiology and Genetics, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Ficher H.M., 1994** : Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58: pp 352-386.
- Frank B., 1889** : Uber die Parasiten in den Wurzelan schwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung.* 24, pp 377-38.
- Fyad Lameche F.Z., 2007** : Les Légumineuses ou Fabacées. Cours présentés à la faculté des Science. Département de Biotechnologie. Université d'Oran Es-senia. Algérie.
- Gage DJ., 2004** : Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68: pp 280-300.
- Garrity G.M., Bell J.A et Lilburn T.G., 2004** : Taxonomie outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. second edition.
- Geurts R et Bisseling T., 2002** : *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell* 14, pp 239-249.
- Graham P.H., Vance C.P., 2003** : Legumes importance and constraints to greater utilization to greater utilization. *Plant Physiology*, 131: pp 872-877.
- Guignard J.L., Dupont F., 2005** : Botanique. 13ème Edition Masson Paris.
- Guiraud J.P., 1998** : Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.
- Hajimehdipoor H., Sadat-Ebrahimi SE., Amanzadeh Y., Izaddoost M., Givi E., 2010**: Identification and quantitative determination of 4-Hydroxyisoleucine in *Trigonella foenum graecum* L. *Iran. J. Medicinal Plants.* 9 (6): pp 29-34.
- Harchane H., El Addas H., Amsaguine S., El Amrani N., Radallah D., 2012** : effet d'extract aqueux des graines de frnugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) sur amélioration de profil et la prise de poids chez le rat. Springer –verlag France : pp 1-6.
- Hopkins W. G., 2003** : Physiologie végétale. Université des sciences de Lille. Edition de boeck. pp 99-120.
- Hu C.Y et Lin L.P., 2003** : Characterisation and purification of hydrolytic enzymes in *Sinorhizobium fredii* CCRC15769. *World J. microbial. biotech.* 19(5), pp 515-522.

- Hu C.Y., Tseng W.S., Hsieh C.L., Chen Y.C., Cheng et Yaang S.S., 2009** : Electron microscopy analysis of caroxymethylcellulase in rhizobia. *Soil. Biol.biochem.* 41 : pp431-434.
- Joffin J.N., Leyval Guy., 2006** : Microbiologie technique. *Dictionnaire des techniques. Tome1*, 4e édition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.
- Jordan DC., 1984** : *Rhizobiaceae* In N. R. Krieg and J. G. Holt editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. pp 234-242.
- Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A., Stevens P., 2001** : Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck. Kalita.
- Kumari B. S., Ram R. M., Mallaiha K. V., 2008** : Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from Indigofera. African Journal of Microbiology Research Vol 3(1) pp 010-014.
- Lakhal A., Bensoltane A., Atik F., 2008** : Characterization of *Rhizobium sp.* Isolated from root of *Vicia faba*. multiple antibiotics resistance. Egypt J of Appl Sc 23 (12A): pp 62-73.
- Lanotte P., Merghetti L et Quentin R., 2007** : Démarche de l'examen bactériologique. In Denis F, Ploy M.C, Martin C, Bingen E, Quentin R. (eds). *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. Elsevier Maasson SAS. pp 5-32.ISBN : 978-2-294-01172-6.
- Lee G.J., Wu X., Shannon J.G., Sleper D.A., Nguyen H.T., 2007** : Chapter 1: Soybean. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Oilseeds, de 1-53.C. Kole (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Le Folc'h E., 1983** : Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Programme flore et végétation tunisienne, Tunis.
- Lerouge P., Roche., Faucher C., Maillet., Truchet G., Prome JC., Denarie J., 1990** : Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: pp 781-784.
- Lewis G.P., Schrire B.D., Mackinder B.A., Lock J.M., 2003** : Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Lucinski R., Polcyn W., et Rotayczak L., 2002**: *Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes*. Acta Biochimia Polonia.49 (2): pp 537-546.
- Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002** : Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22 : pp 321–329.
- Maatallah J., El Bekkay B., Juan S., Carmen L., 2001**: Phenotypic characterisation of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22 (2002). pp 321-329.

- Mahobia Vertica., Mahna Suresh K., 2002:** Characterization of Rhizobia Isolated from *Prosopis cineraria* in Jodhpur Region, Rajasthan, India. Improvement and Culture of Nitrogen Fixing Trees. Vol 5 N° 1 pp 3-5
- Maria J.S., Vandillewjin P., Martinez-Abarka F., José I., Zurdo J., Toro N., 2004 :** Attachement to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant *Alfalfa nodulating* bacteria *Rhizobium sp.* Lpu83. FEMS .Microbiol. Ecol. 48 : pp 71-7.
- Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J., 2009 :** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? Trends Microbiol 17: pp 458–466.
- Mateos P.F., Baker D.L., Petersen M., Velázquez E., Jiménez-Zurdo J.I., Molina EM., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D.H., Dazzo F.B., 2001 :** Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*–legume symbiosis. Can. J. Microbiol. /Rev. can. microbiol. 47(6): pp 475-487.
- Mateos P.F., Jose I., jimenez-zurdo., jin chen., Squartini A., Haack S.K., Martinezmolina S., Hubbell D.H., Dazzo F.B., 1992 :** *Cell-Associated Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in Rhizobium leguminosa Biovar Trifolii.* Applied and Environmental Microbiology, Vol 58, N°6, pp 1816-1822.
- Mehani M., Segni L., 2012 :** Antimicrobial Effect of Essential oil of plant *Trigonella foenum-graecum* on some Bacteria Pathogens. World Academy of Science. Engineering and Technology. 69 : pp 358-360.
- Mehrafarin A., Rezazadeh S., Naghdi Badi H., Noormohammadi Gh., Zand E., Qaderi A., 2011 :** A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) as a valuable medicinal plant and multipurpose. Journal of Medicinal Plants. 10(37): pp 6–24.
- Mekkiou R., 2005 :** Thèse de doctorat. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre Genista (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox* pp199.
- Mercado-Blanco J., Toro N., 1996 :** Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *MPMI.*, 9, pp 535-545.
- Mobely LTH., 1992 :** Urease Microbial. Lederberg J. Eds. Encyclopedia of Microbiology. 4: pp 327-346.
- Moulin L., Béna G., Boivin-Masson C., Steplowski T., 2004 :** Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: pp 720-732.

- Moulin L., 2002** : Etudes moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse de gène *nod A* identification des rhizobia au sein des béta-protéobactéries. Thèse de doctorat Université Claude Bemard-Lyon1 I. p 289
- Nazar A., Nasri E.I., et El Tinay A.H., 2007** : Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. *Food Chemistry*, **103**(2): pp 582- 589.
- Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., Delajudie P., Ndoye I., 2002** : Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des Rhizobiums *d'Acacia tortilis* (Forsk) Hayne subsp. *Raddiana* (Savi) Brenan. African Journal of Science and Technology. Science and Engineering Series 3 (1): pp 33-43.
- Noel K.D., 2009** : Bacteria *Rhizobia*. Encyclopedia of microbiology, SCHAECHTER M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA, **3**, pp 877-893.
- Newton WE., 2007** : Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Ferguson BH, SJ NWE (eds) Biology of nitrogen cycle. Elsevier, Amsterdam, pp 109–130.
- Ott T., Van Dong JT., krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigne berger P., Udvardi MK., 2005** : Symbiotic leghemoglobines are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol*. **15** : pp 531-535.
- Palinska KA., Jahnus T., Rippka NT., de Marsac 2000** : *Prochlorococcus marinus* stain pcc 9511, a picoplanktonic cyanobacteris synthesize the smallest uréase. *Microbiology*. **146**: pp 3099-3107.
- Patriarca EJ., Tatè R., Ferraioli S., et Iaccarino M., 2004** : Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol*. **234**: pp 62-201.
- Patrícia P., Pinto R., Raposeiras A.M., Macedo L., Seldin E., Paiv Nad M.H., Sá., 1998** : Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating Rhizobium strains. *Revista de Microbiologie*. Print ISSN 0001-3714.
- Pelmont J., 1995** : Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Vol 2. pp 541-572. Office des Publications Universitaires.
- Pelmont J., 2005** : Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.
- Perry J.J., staley J.T., Lory S., 2004** : Microbiologie. Edition Dunod, Paris. pp 633-635.
- Petropoulos GA., 1973** : Agronomic, genetic and chemical studies of *Trigonella foenum graecum* L. (PhD dissertation). England: Bath University.

- Petropoulos GA. ,2002** : Fenugreek, The Genus *Trigonella*. London and New York: Taylor and Francis. p 255.
- Pinto F.G.S., Hungria M et Mercante F.M., 2007** : Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soit boil. biochem. 39 (8): pp 1851-1864.
- Pousset J., 2003** : Engrais verts et fertilité des sols. 2ème Edition Agridecisions, Paris.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Claire-Michèle., Bacq-Calberg., Dusart J., 2007** : Microbiologie, chapitre .22.les bactéries. Les protéobactéries, .Edition. De Boeck Université. p 492.
- Priefer UB., Aurag J., Boesten B., Bouhmouch I., Defezy R., Filali-Mltouf .A, Miklis M., Moawad H., Mouhsin B., Prell J., Schlüter A., Senatore B., 2001** : Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. J Biotechnol 91:pp 223–236.
- Pujic P., Normand P., 2009** : La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes *Actinorhiziennes*. Biofuture 298 , pp 26-29.
- Quezel P., Santa S., 1962** : Nouvelle flore de l'Algérie et de la région désertique méridionale, p 514.
- Rai A., 2006** :Correlates between vegetable consumption and gallbladder cancer, Eur J Cancr Prev.v. Apr;15(2):pp 134-7
- Raju J., et al., 2004** : Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(8):pp 1392-8.
- Raposeiras R., Patrícia P.P., Raul V.M. P., Lucy S., Paiva E., Scotti M.R., N. M.H. Sá., 2002** : Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. Brazilian Journal of Microbiology. Print ISSN pp 1517-8382.
- Rathore M.S., Shekhawat N.S., Gehlot H.S., 2009**: Need of Assessing Rhizobia for Their Plant Growth Promoting Activities Associated with Native Wild Legumes Inhabiting Aravalli Ranges of Rajasthan, India. Botany Research International 2 (2) pp 115-122.
- Rasanen L., 2002** : Biotic and abiotic factor infl ueninig the development of N<sub>2</sub> –fixing Symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia*, these de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd, p 220.

- Raven., Evert., Eichhorn., 2003** : traduction de la 6e édition américaine, Éditions de Boeck Université p 944.
- Raven., Evert., Eichhorn., 2007** : Biologie végétale. 2e édition. Edition de boeck. Paris France. pp 653-660.
- Räzänen L.A., 2002** : Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat. Université d'Helsinki. Finland.
- Raza S., Jürnsgard B., Abou-Taleb H., and Christiansen J. L., 2001** : Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics Letters in Applied Microbiology. pp. 32; pp 379-383.
- Ribes G., Sauvaire Y., Da Costa C., Baccou J. C., and Loubatieres-Mariani M. M. 1986** : Anti-diabetic effects of subfractions from fenugreek seeds in diabetic dogs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 182, pp 159-166
- Rodriguez-Quinones F., Banfalvi Z., Murphy P., Kondorosi A., 1987** : Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. Plant Molecular Biology. **8**: pp 61-75.
- Saadallah k., Drevon J.J., Abdelly C., 2001** : Nodulation et croissance nodulaire chez haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. INRA, EDP Science, 2001S. Agronomie 21 : pp 627-634
- Sebbane N., Boulila A., Sahnoune M., Ramdani N., de Lajudie P., Benallaoua S., 2004** : Caractérisation phénotypique de souches de rhizobia isolées de quatre espèces de *Medicago* dans la vallée de la Soummam (Algérie). Sciences & Technologie C N°21 pp 5-10.
- Sahgal M., et Johri B.N., 2003** : The changing face of rhizobial systematics. *current Science*.84 (1): pp 43-48.
- Salhi S., Fadli M., Zidane L., et al., 2010** : Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc) Lazaroa 31: pp 133–46.
- Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S., 2002**: Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. Mol Plant Microbe Interact. 15: pp 866-874.
- Schryver T., 2002** : Fenugreek. *Total Health*, **24**: pp 42-44.
- Simon J-P., 2005** : Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. Préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal.
- Sodowsky M. J., Keyser H.H., Ben Bohlool B., 1983** : Biochemical Characterization of Fast- and Slow-Growing Rhizobia That Nodulate Soybeans *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33** (4) : pp 716-722.

- Somasegaran P., Hoben HJ., 1994** : Handbook for Rhizobia. Springer verlage. Eds .Inc. New York. p : 450.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1985**: Methods in legumes-rhizobium technology. pp1-331. Niftal. University of Hawaii.
- Smil V., 2002** : Biofixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. In : Nitrogen fixation: global perspectives. T.M. Brogan *et al.* ed ., CAB International, New York, pp 7-9.
- Spaink H.P., 2000** : Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54 : pp 257-288.
- Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S., Nuti M.P., 2002** : *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly „*Rhizobium hedysari*“), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: pp 1267–1276.
- Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J et May GD., 2006** : Genetics and functional genomics of legume nodulation. Curr Opin Plant Biol. 9: pp 110-121.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P., 1998** : Metabolic properties, stress tolerance and macro molècular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. J. Appl. Microbiol. 84: pp 81-89
- Sur P et al., 2001** : *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. *Phytother Res*, 15(3): pp 257-9.
- Thami-Alami I., Elboutahiri N., Udupa SM., 2010** : Variability in natural population of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterr. Semin. 92: pp 265-269.
- Thami Alami I., El-Mzouri E.H., 2000** : Etude de l'efficacité et de la persistance des souches de *Rhizobium de sullae*. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*. 2: pp 321-325.
- Tighe S.W., de Lajudie P., Dipietro K., Lindstrom K., Nick G., Jarvis B.D.W., 2000** : Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the sherlock Microbial Identification System. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: pp 787-801.
- Tortora GJ., Funk BR., Case CL., 2003** : Introduction à la microbiologie. Eds du Renouveau Pédagogique Inc. p : 945.

- Vasilchenko IT., 1953** : Reports on the species of the genus *Trigonella*. In: Flora and taxonomy of higher plants. Moscow & Leningrad: Publishing house of the Academy of Science of the SSSR (Ser. 1:10) pp. 331–333. (In Russian).
- Vats V., Yadav SP., Grover JK., 2003** : Effect of *T. foenum-graecum* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. J. Ethnopharmacol. 85, pp 237-242.
- Vessey J.K., Chemining G.N., 2006** : The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarium* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. Soil Biology & Biochemistry 38: pp 153-163.
- Vincent B.B., 2002** : Revue de littérature : cycle de l'azote Mémoires et thèses de l'université Laval.
- Vincent JM., (1970)**. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Vriezen Jan A.C., De Bruijn Frans J., and Nüsslein K., 2007** : Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperature. Appl. Environ. Microbiol. 73(11):pp 3451- 3459.
- Wani S.P., Rupela O. P., and Lee K.K., 1995** : Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil* 174:pp 29-49.
- Weir B.S., 2006** : Systematics, Specificity and Ecology of New Zealand Rhizobia. Ph D thesis school of Biological Sciences, the university of Auckland and New Zealand Rhizobia Website : [www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html](http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html)
- Weir B.S., 2016** : The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: X Jan, 2016.
- Werner D., 1992**: Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.
- Zahran H.H., 2001** : *Rhizobium-legume* Symbiosis and Nitrogen Fixation Under Severe Condition and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Review sp. 63(4) : pp 968-98.
- Zahran H.H., 1991** : Conditions for successful *Rhizobium-legume* symbiosis in saline environment. *Biol. Fertil. Soils*. 12, pp 73-80.
- Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., Dreyfus B., and de Lajudie P., 2001**: Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. pp 380-395.

**Zandi P., Shirani Rad AH., Daneshian J., Bazrkar Khatibani L., 2013** : Evaluation of nitrogen fertilizer and plant density effects on yield and yield components of fenugreek in double cropping. Journal of Plant Production (Chamran University, Ahvaz), **35** (4): pp 81–91.

Annexe

# Annexe 1

## Milieux de culture et solutions utilisées

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

Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
NaCl	0.10
MgSO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0.20
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min

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

YMB	1000 ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min

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

YMB	1000 ml
Solution stock de Rouge Congo	10 ml
Agar	18

pH 6.8

Autoclavage 120 °C pendant 20 min

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

#### **Composition de milieu YMA+ BTB (bleu de Bromothymol) en g/l**

YMB 1000ml

Solution stock de bleu de Bromothymol 5ml

Agar 15

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

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

#### **Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar+ pourpre de bromocrésol) en g/l**

Glucose 10

Peptone 5

Solution stock de BCP 10 ml

Agar 18g

pH 6,8

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

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

Tryptone 5

Extrait de levure 3

CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O 0,87

pH 6,8

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

## **Annexe 2**

### **Coloration de Gram**

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

- Recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute,
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone,
- Laver à l'eau distillée
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir pendant 1 minute,
- Laver à l'eau distillée,
- Sécher avec un papier absorbant,
- Observer au microscope (objectif x 100).

## Annexe 3

### Tableaux des différents résultats

**Tableau 1 :** résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats et de souche de référence au NaCl après 24h d'incubation.

	N1C1	N1C2	N2C3	N3C4	N4C5	N4C6	N4C7	R08
1 %	0.347	0.140	0.469	0.353	0.294	0.382	0.262	0.272
2%	0.356	0.183	0.248	0.232	0.264	0.427	0.485	0.285
3%	0.237	0.243	0.152	0.070	0.61	0.310	0.405	0.137
5%	0.062	0.066	0.090	0.213	0.126	0.177	0.249	0.070
10%	0.073	0.079	0.083	0.091	0.076	0.076	0.076	0.040

**Tableau 2 :** résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats et de souche de référence au NaCl après 48h d'incubation.

	N1C1	N1C2	N2C3	N3C4	N4C5	N4C6	N4C7	R08
1%	0.474	0.227	0.565	0.686	0.520	0.602	0.621	0.356
2%	0.550	0.400	0.158	0.162	0.191	0.429	0.339	0.385
3%	0.459	0.198	0.193	0.265	0.244	0.477	0.390	0.468
5%	0.175	0.205	0.038	0.217	0.128	0.114	0.270	0.281
10%	0.007	0.012	0.010	0.015	0.003	0.024	0.012	0.013

**Tableau 3 :** résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats et de souche de référence au pH après 24h d'incubation.

	N1C1	N1C2	N2C3	N3C4	N4C5	N4C6	N4C7	R08
pH 3	0.302	0.359	0.347	0.429	0.378	0.441	0.382	0.008
pH 4.5	0.288	0.388	0.764	0.538	0.242	0.364	0.318	0.146
pH 6.8	0.177	0.201	0.120	0.242	0.230	0.076	0.520	0.221
pH 8	0.203	0.453	0.313	0.448	0.486	0.400	0.444	0.126
pH 9	0.286	0.433	0.094	0.133	0.625	0.545	0.467	0.155
pH 10	0.355	0.970	0.541	0.691	0.571	0.655	0.650	0.166

**Tableau 4 :** résultats de la mesure de la DO pour le test de la tolérance des isolats et de souche de référence au pH après 48h d'incubation.

	N1C1	N1C2	N32C3	N3C4	N4C5	N4C6	N4C7	R08
pH 3	0.044	0.169	0.275	0.168	0.118	0.149	0.141	0.073
pH 4.5	0.574	0.531	0.354	0.514	0.529	0.659	0.704	0.297
pH 6.8	0.266	0.500	0.347	0.528	0.563	0.571	0.469	0.316
pH 8	0.638	0.523	0.603	0.611	0.784	0.704	0.606	0.309
pH 9	0.435	0.667	0.205	0.583	0.580	0.599	0.618	0.316
pH 10	0.510	0.624	0.682	0.649	0.796	0.789	0.927	0.223

## Analyse phénotypique des isolats nodulant *Trigonella gladiata* Stev.

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

### Résumé :

Ce travail a été réalisé afin de mettre en évidence les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. , dans la région de l'Est algérien wilaya de Khenchela.

La caractérisation de 07 souches isolées porte sur une identification morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui englobe des tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels ont été réalisées, et souche de référence *Rhizobium nepotum* R08 ont été utilisées pour la comparaison.

Les résultats obtenus montrent que nos isolats sont des colonies homogène de forme circulaire de croissance rapide, des bacilles à Gram négatif, osmotolérantes et thermotolérants peut vivre dans les sols acide ainsi que les sols alcalins, utilisée une large gamme de substrats carbonées et assimilent préférentiellement les disaccharides.

Sur la base des caractères étudiés, les isolats portes les mêmes caractères phénotypique des (BNL).

**Mots clés :** *Trigonella*, caractérisation, phénotypique, *Rhizobium*, BNL, nodules.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC),  
Faculté des Sciences de la Nature, Université des frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Guergouri Ibtissem (Maître -assistante- UFM Constantine).  
**Rapporteur :** Chabbi Rabah (Maître-Assistant « A » - UFM Constantine),  
**Examineur :** Gaci Meriem (Maître -assistante -UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 19/06/2017