



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 عاوم الطبيعة و الحياة

Département : microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا.

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Ecologie et environnement

Spécialité : Ecologie microbienne

Intitulé :

Analyse phénotypique du partenaire symbiotique de la légumineuse
***Trigonella foenum-gracum* L.**

Présenté et soutenu par : *HANNACHI Hafsa-Sara*
BENTA HAR Maria

Le : 14/07/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : **ABDELAZIZ Widad** (Maitre-de conférences « B » - UFM Constantine).

Rapporteur : **CHABBI Rabah** (Maitre-assitant « A » - UFM Constantine).

Examineurs : **GUERGOURI Ibtissem** (Maitre-assistante « A » - UFM Constantine)

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à notre encadreur **Mr Chabbi Rabah** « maitre assistant « A » UFM- Constantine pour ses recommandations et ses discussions perspicaces sa présence continue, aussi pour les orientations qui ont beaucoup enrichi notre travail et pour avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de cette recherche, ainsi pour sa compétence et sa gentillesse.

Grand merci aux membres de jury : **Mlle Abdelaziz Widad** « maitre de conférences « B » -UFM-Constantine pour acceptant de présider le jury de la soutenance et **Mme Guergouri Ibtissem** « maitre assistante « A » UFM-Contantine pour examiner et juger ce modeste travail.

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

Une mention spéciale pour Mme : **Oulmi Lamia** pour son soutien moral et ses nombreux conseils et remarques pertinents.

Nous remercions également les techniciennes et les professeurs du département de Microbiologie de l'université des frères Mentouri 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.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A Mes chers parents Salim et Mounira, 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

Que Dieu les protège et les préserve pour nous.

A mes frères Djamel Eddine, sa femme Fatima Zohra et mon petit ange Mouhamed Anes, mon petit frère Ibrahim Mouhamed Mourtada.

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 Lokmen, ses parents Nadjib et Leila et sa sœur Bouchra.

A mes oncles : Yacine, Abbessé, Khaled, Kamel et leur femmes : Nadia et Sihem

A mes chères : tante Fadila, sa fille Nacera mon âme sœur.

A mes amies : Anouar, Halima, Hanene, Sabrina, Zineb, Souheila, Manel, Maha.

A toute ma famille.

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

Et tous ceux que j'aime.

Et qui m'aime.

Hafsa-Sara

Dédicaces

De profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

A mon père Abde Alhamide qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

Je le dédie également à ma mère Habiba qui est œuvrée pour notre réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices et ses conseils.

Ma sœur Fatima

Que Dieu les protège et les préserve pour nous.

A mes frères Othmen, sa femme Bouchra et ma chère nièce Meriam,

Mohamed, Boubaker

A mes chères : tante Souad. Rayene.

A mes amies : Sara, Malika, Amina, Maha,

A toute ma famille.

Et tous ceux que j'aime.

Et qui m'aime

Maria

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le but d'analyser phénotypiquement des isolats nodulants *Trigonella foenum-gracum* L. cultivés dans l'Est Algérien dans deux Wilaya : Mila et Skikda. Dans cette étude, un total de 12 isolats ont été obtenus à partir des nodules racinaires, caractérisés par une étude phénotypique (tests biochimiques, nutritionnels, et tests physiologiques) donnant une description comparable à celle des BNL.

L'étude montre que tous les isolats ont une croissance rapide. Ce sont des bâtonnets à Gram-, cellulase+, uréase+, nitrates réductase+, oxydase- et catalase+.

Les isolats sont capables d'utiliser une moyenne gamme de substrats carbonés et azotés.

L'étude de la tolérance au différents stress abiotiques a montré que nos isolats peuvent croître à un large intervalle de pH et températures, ainsi qu'une grande tolérance à la salinité allant jusqu'à 10% de NaCl.

Mots clés : *Trigonella foenum-gracum* L., BNL, isolats, caractères phénotypiques, nodules racinaires.

Abstract

This work has been realized for phenotypic analysis of nodulating isolates *Trigonella foenum-gracum* L. grown in the Algerian East from two regions: Mila and Skikda.

In this study, 12 isolates were isolated from root nodules. Characterized by a phenotypic study (biochemical tests, nutritional tests, and physiological tests) which gives a description comparable to BNL.

The study showed that all isolates are growing rapidly. They are rods, Gram-, cellulase⁺, urease⁺, nitrate reductase⁺, oxidase⁻ and catalase⁺. Isolates are able to use a mid range of carbon substrates and nitrogen

The study of tolerance to different abiotic stress showed that our isolates can grow at a wide pH interval and temperatures, as well as a high tolerance to salinity going up to 10% of NaCl.

Key words: *Trigonella foenum-gracum* L., BNL, isolates, phenotypic characters, root nodules

ملخص

هذا العمل تم انجازه بغرض التحليل المظهري للعزلات المكونة للعقد الجذرية لنبات الحلبة-*Trigonella foenum-gracum* L. المزروعة في الشرق الجزائري في ولايتي ميلة و سكيكدة.

في هذه الدراسة ، مجموع 12 سلالة تم عزلها من العقد الجذرية ، اجريت عليها دراسة مظهرية (اختبارات بيوكيميائية، اختبارات غذائية، اختبارات فيسيولوجية) و التي اعطت وصف مشابه للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية .BNL

الدراسة اظهرت ان كل العزلات لها نمو سريع، عصيات سالبة الغرام،

cellulase +, uréase+, nitrate réductase +, catalase+, oxydase+

العزلات قادرة على استعمال مجموعة من المواد الكربونية و الازوتية .

دراسة الاضطرابات اللاحيوية اثبتت ان العزلات قادرة على النمو ضمن مجال واسع من pH، و الحرارة اضافة الى مقاومة كبيرة من الملوحة تصل الى 10% من NaCl .

الكلمات المفتاحية : *Trigonella foenum-gracum* L.، العقد الجذرية، BNL، دراسة مظهرية ، عزلات.

Liste des figures

		Page
Figure 1	Cycle d'azote pour les écosystèmes terrestres.....	2
Figure 2	Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon et al, 2004).	4
Figure 3	La plante <i>Trigonella foenum-gracum</i> L.	7
Figure 4	Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse (Faghire, 2012).	17
Figure 5	Plante extraite avec son appareil racinaire	20
Figure 6	Conservation des nodules (Vincent, 1970).	21
Figure 7	Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent,1970)	22
Figure 8	Variation des couleurs de bleu de bromothymol.	23
Figure 9	Croissance sur milieu YMA	28
Figure 10	Croissance sur YMA+ rouge Congo.	28
Figure 11	Acidification du milieu GPA+BCP isolat B10*.	29
Figure 12	Acidification du milieu YMA+BTB.	30
Figure 13	Coloration de Gram observée sous microscope optique (GX100).	31
Figure 14	Test de nitrate (+)	32
Figure 15	Test uréase négatif	33
Figure 16	Test uréase positif	33
Figure 17	Test de cellulase positif	34
Figure 18	Test d'oxydase	36
Figure 19	Assimilation de sources de carbone par les souches testées.	38
Figure 20	Croissance des isolats en présence de certains acides aminés.	41
Figure 21	Croissance des isolats sur différentes températures.	43
Figure 22	Effet du NaCl sur la croissance des groupes de souches testées	45
Figure 23	Effet de différents pH sur la croissance des isolats.	47

Liste des tableaux

		Page
Tableau 1	Principaux constituants chimiques de <i>Trigonella foenum-gracum</i> .	9
Tableau 2	Classification actuelle des rhizobia.	13- 14
Tableau 3	Isolats utilisées dans cette étude.	27
Tableau 4	Assimilation des sources de carbone par les souches testées.	37- 38
Tableau 5	Assimilation de source d'azotes par les isolats.	40
Tableau 6	Effet de la température sur la croissance des isolats.	42

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ADNr : Acide Désoxyribo-Nucléique Ribosomal

BCP : *Pourpre de Bromocrésol*

BNL : Bactéries Nodulant Légumineuses

BTB : *Bleu de Bromotymol*

CMC : Carboxy-Méthyl-Cellulose

DO : Densité Optique

NR : Nitrate Réductase

GPA : *Glucose Peptone Agar*

YMA : *Yeast Mannitol Agar*

YMB : *Yeast Mannitol Broth*

pH : potentiel Hydrogénique

TY : Tryptone Yeast

RC : Rouge Congo

PHB : Poly- β -Hydroxybutyrate

FN : Facteur Nod

Table des matières

Remerciement

Résumé	i
Abstract.....	ii
ملخص	iii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations.....	vi
Table des matières	
Introduction	1

Chapitre 1

1. Fixation biologique de l'azote	2
1.1 Nitrogénase	3
1.2 Intérêt de la fixation symbiotique d'azote.....	4
2.Symbiose.....	4
2.1 Symbiose Rhizobium-légumineuses	5
3.Les légumineuses	5
3.1. Classification.....	5
4Légumineuse Trigonella foenum-gracum L.	6
4.1 Définition	6
4.2 Origine	6
4.3 Description botanique	6
4.4 Les principaux constituants de la plante	7
4.5 Activités pharmacologiques	8
4.6 Activité anti-diabétique.....	8
4.7 Activité anti-oxydante	8
4.8 Activité anti-cancéreuse et anti tumorale	9
4.9Activité anti-inflammatoire.....	9
4.10 Activité hypocholestéromiante.....	9
4.11 Utilisation traditionnelle.....	9
4.12 Classification taxonomique	10
5. Rhizobium.....	10
5.1Généralité.....	10
5.2 Caractères généraux	10
5.3 Caractères symbiotiques.....	11
5.4 Caractères cultureux et biochimiques	11
5.4.1Caractères cultureux.....	11
5.4.2Caractères biochimiques	11

5. Classification.....	11
6 Etablissement de l'association symbiotique entre rhizobium et la plante légumineuse	14
6.1 Les signaux moléculaires	14
6.2 Les gènes de nodulation	14
6.2.1 Les gènes nod régulateurs (gène Nod D).....	14
6.2.2 Les gènes nod (A, B, et C).....	14
6.2.3 Les gènes <i>nod</i> spécifiques.....	15
6.2.4 Les facteurs nod	15
6.3 Les étapes du nodulation.....	15
6.3.1 Echange de signal d'infection.....	15
6.3.2 Infection	15
6.3.3 Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	16
6.4 Les gènes <i>nif</i> et les gènes <i>fix</i>	17
6.4.1. Les gènes <i>nif</i>	17
6.4.2. Les gènes <i>fix</i>	17
chapitre2	
1. Isolement des bactéries à partir des nodules	19
1.1. Collecte des nodules.....	19
1.2 Conservation des nodules.....	20
1.3 Isolement des bactéries à partir des nodules	21
1.4 Stérilisation des nodules.....	21
1.5 Ecrasement des nodules	21
1.6 Isolement des souches.....	21
2. Caractères cultureux	22
2.1 Principaux milieux de culture utilisés.....	22
2.2 Purification des isolats	23
2.3 Vitesse de croissance	23
2.4 Examens microscopiques et Macroscopiques.....	23
2.4.1. Examen microscopique.....	23
2.4.2 Conservation des isolats.....	24
3 Caractères phénotypiques	24
3.1 Tests biochimiques.....	24
3.1.1 Réduction de nitrates.....	24
3.1.2 Hydrolyse de l'urée	24
3.1.3 Activité cellulolytique.....	24
3.1.4 Recherche de la catalase.....	25
3.1.5 Recherche de l'oxydase.....	25
3.2 Tests nutritionnels	25
3.2.1 Utilisation des sucres comme seule source de carbone.....	25
3.2.2 Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote	2
3.3 Tests physiologiques	2

3.3.1 Effet de la température	2
3.3.2 Tolérance au chlorure de sodium (NaCl)	2
3.3.3 Effet du pH.....	2
chapitre 3	
1 Caractères cultureux	27
1.1 Croissance sur milieu YMA et sur milieu YMA+RC	28
1.3. Vitesse de croissance.....	30
2 . Examen microscopique	31
3. Tests biochimiques	31
3.1 Réduction des nitrates	31
3.2 Hydrolyse de l'urée	32
3.3 Activité cellulolytique.....	34
3.4 Recherche de la catalase.....	34
3.5 Recherche de l'oxydase.....	35
4 Tests nutritionnels	36
4.1 Utilisation des sucres comme seule source de carbone	36
4.2 Utilisation des acides aminés comme source d'azote	38
5 Tests physiologiques	40
5.1 Effet de la température	40
5.2 Tolérance en chlorure de sodium NaCl.....	42
5.3. Effet du pH.....	45
conclusion	48
Références bibliographiques	50
Annexes	

Introduction

L'azote (N₂) est un élément présent sous différentes formes, dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère (matière organique). Il est très abondant dans la croûte terrestre mais cette forme est inaccessible à la plus part des êtres vivants.

La fixation biologique est la transformation d'azote moléculaire en azote ammoniacal. Elle permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et elle est due à l'activité des microorganismes très spécifiques (diazotrophes), se fait par deux processus naturels différents : fixation libre et fixation symbiotique.

Les légumineuses constituent une famille très importante de plantes à fleurs, dont l'une des propriétés majeures est qu'elles peuvent former un partenariat (association symbiotique) avec une classe des bactéries (BNL) capable de fixer l'azote atmosphérique inerte. Elles développent des nodules sur leurs racines, dans lesquelles les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante. Cette symbiose présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés.

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).

Dans ce travail, la légumineuse étudiée est fenugrec (*Trigonella foenum-gracum* L.) est une légumineuse annuelle appartenant à la famille des Fabaceae. C'est l'une des plus anciennes plantes médicinales et culinaires connues dans l'histoire.

Dans le cadre du travail relatif à ce mémoire, nous sommes fixés l'objectif suivant :

Analyse phénotypique des isolats nodulant *Trigonella foenum-gracum*.L cultivée dans deux régions de l'Est Algérien, Mila et Skikda

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Etude morphologique et microscopique des isolats
- Caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests :
 - Recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase, oxydase, catalase).
 - Tests nutritionnels (source de carbone, source d'azote).
 - Effet des facteurs abiotiques (Température, NaCl , pH).

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Fixation biologique de l'azote

Le diazote (N_2) est un gaz inerte représentant 78% de la composition de l'atmosphère, mais cette forme est inaccessible à la plupart des êtres vivants. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries, dites diazotrophes (Day *et al.*, 2001) qui ont des organismes qui vivent librement dans le sol et l'eau et certains d'entre eux sont engagés dans des symbioses. Ces diazotrophes incluent des cyanobactéries, des espèces de *Bacillus* et de *Clostridium*, des souches de *Klebsiella pneumoniae*, ainsi que des membres des familles des Azotobacteriaceae et des Rhizobiaceae et de l'ordre des Rhodospirillales (Luciano, 2015).

La transformation de l'azote moléculaire en azote combiné est appelée fixation d'azote ; elle peut se faire selon des voies biologiques ou chimiques (Figure1) (Chafi *et al.* 2009).

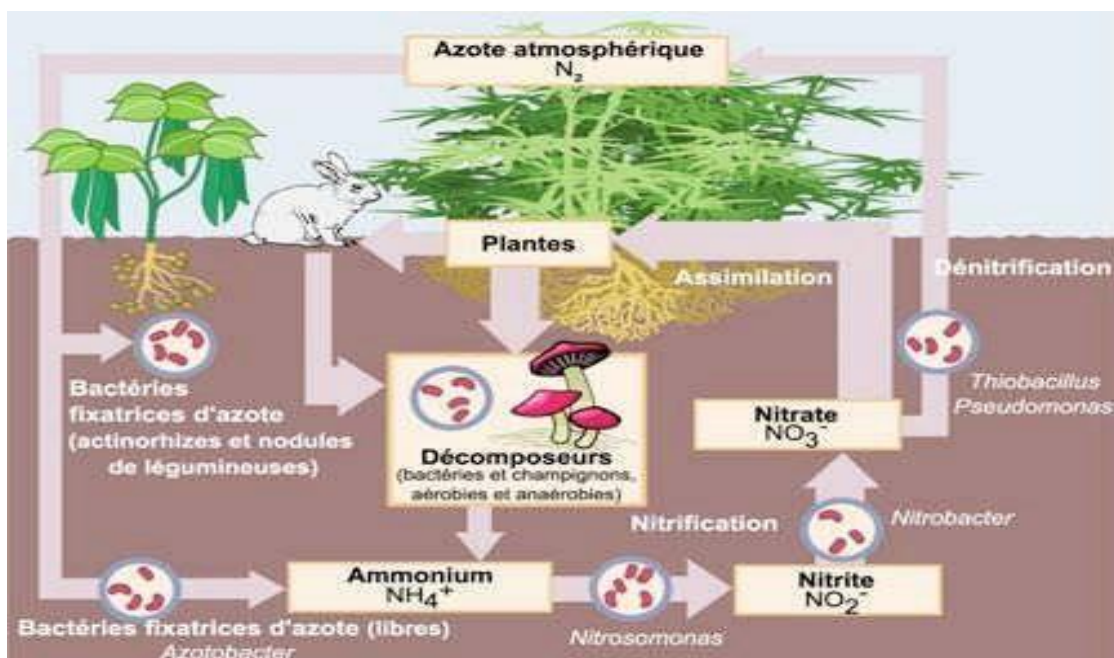


Figure 1 : Cycle d'azote pour les écosystèmes terrestres (Pujik et Normand 2009).

La fixation biologique de l'azote représente environ 180 millions de tonnes d'azote fixé par an, soit plus que 100 millions de tonnes dans l'écosystème terrestre (Bogusz et Franche, 1985; Franche *et al.* 2009). Cette fixation est catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase (Luciano, 2015).

1.1 Nitrogénase

En 1934, Burk a inventé le terme nitrogénase pour l'enzyme qui catalyse la conversion de N_2 en forme d'azote bioaccessible et initié la première véritable étude de la nitrogénase dans les cellules vivantes (Hoffman *et al*, 2014). Formé de deux protéines nommées dinitrogénase (protéine MoFe) et dinitrogénase réductase (protéine Fe) (Madigan et Martinko, 2007) et elle est inactivée par l'oxygène moléculaire (O_2) (Jerome J *et al*, 2004).

La protéine Fe est un petit composant homodimère, possédant un cluster « fer-soufre » (4Fe-4S), fonctionne comme un transmetteur d'électrons-ATP dépendant, à partir d'un donneur protéique tel que la flavodoxine et ferrédoxine, au deuxième composant plus large hétérotétramère : la protéine MoFe, qui contient le site pour la fixation et la réduction de l'azote. Elle possède deux types de cluster : le P cluster (8Fe-7S) et le co-facteur (MoFeco) qui est le site de réduction du substrat (Ferguson, 1998 ; Dixon et Kahn, 2004).

La réaction requiert un donneur d'électrons en plus de l'adénosine triphosphate (ATP). Les électrons sont générés de différentes manières dépendamment du métabolisme de l'organisme (Cheng, 2008). Ces électrons sont transférés directement à la flavodoxine ou à la ferrédoxine, transporteurs qui assurent le transfert des électrons de la protéine Fe de la nitrogénase et un cycle de réactions d'oxydo-réduction démarrera en conséquence (Dixon et Kahn 2004; Cheng 2008).

Chez les bactéries fixatrices d'azote, la nitrogénase est codée par un ensemble d'opérons incluant des gènes de régulation (tels que: les gènes *nifLA*), des gènes structuraux (tels que : *nifHDK*) et d'autres gènes supplémentaires (Cheng 2008). Deux molécules de MgATP vont se lier à la protéine Fe réduite puis elles vont être hydrolysées pour qu'il y ait un transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine MoFe (Figure 2).

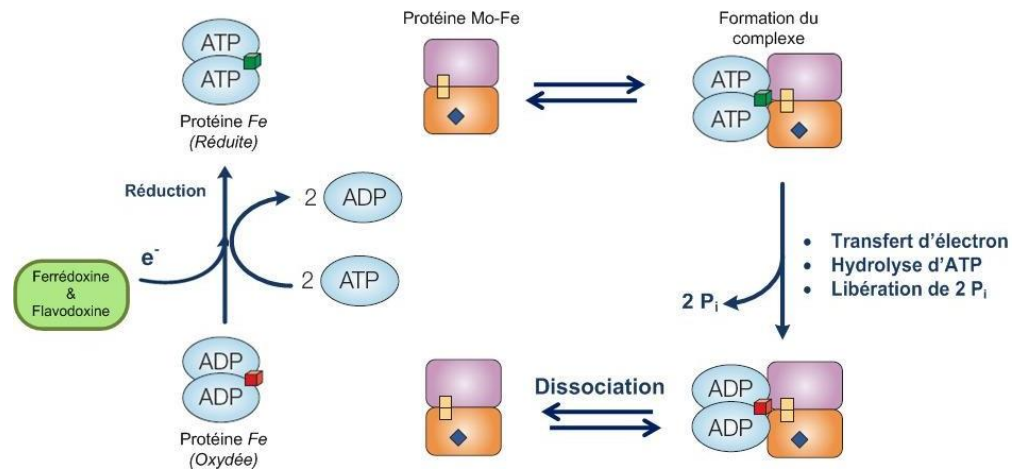


Figure 2 : Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon *et al*, 2004).

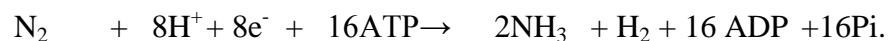
1.2 Intérêt de la fixation symbiotique d'azote

La fixation symbiotique d'azote est l'un des processus biologiques les plus importants qui influencent la production des plantes et la fertilité des sols (Franche *et al*, 2009).

Elle a fait l'objet d'intenses recherches, elle fournit plus de la moitié de l'azote utilisé en agriculture. La fourniture d'azote fixé permet la croissance des plantes hôtes dans des sols qui sans cela, seraient limitant en azote. Celle-ci, réduit simultanément la perte en azote par dénitrification et lessivage (Prescott, 2010).

Au cours de cette association à bénéfice réciproque, la plante fournit de l'énergie et généralement une protection à son symbiote, tandis que celui-ci fournit en retour de l'azote sous des formes variées. (Riah, 2014)

La réduction de l'azote est chère en énergie et nécessite une grande dépense d'ATP. Au moins 8 électrons et 16 molécules d'ATP, quatre ATP en paire d'électrons, sont requis (Prescott, 2010).



2. Symbiose

Association durable et réciproquement bénéfique entre deux ou plusieurs organismes différents, pouvant appartenir à des règnes différents, vivant en équilibre les uns avec les autres et tirant des bénéfices mutuels de cette union, mais pouvant vivre séparément. Les partenaires de cette association sont appelés symbiotes ou

symbionte (Marouf et Joel , 2007).

2.1 Symbiose Rhizobium-légumineuses

L'association symbiotique entre certaines bactéries à Gram négatif fixatrices d'azote atmosphérique et les Légumineuses représente l'un des modèles les plus importants d'interactions entre bactéries et plantes (Michael, 2007). Les plantes peuvent alors bénéficier de l'azote fixé par les bactéries et l'incorporer dans les acides aminés, les nucléotides et dans d'autres composés vitaux contenant de l'azote (Murray, 2008).

La symbiose Légumineuses- Rhizobiums ne peut être assimilée à une simple coexistence issue d'un antagonisme et procurant en définitive des avantages réciproques entre les deux adversaires. Elle constitue en fait une véritable collaboration pour la création d'un processus métabolique irréalisable sans elle (René *et al*, 2011). Dans cet arrangement, la plante procure aux bactéries nourriture et protection, tandis que les bactéries lui fournissent de l'azote "fixé" à partir de l'atmosphère (Paul, 2005).

3. Les légumineuses

Les légumineuses (lat.*leguminosus*, de legumen) plantes dicotylédones herbacées ou ligneuses dont les fleurs sont très visibles et les fruits sont des gousses les feuilles sont généralement alternes et composées (Berthet, 2006). Ils jouent un rôle particulier par leur capacité à exploiter l'azote gazeux (Anne et Christian, 2015).

Les cultures de légumineuses fournissent majoritairement des glucides, et des protéines mais également une panoplie variée selon les espèces des autres éléments (lipides, fibres, éléments minéraux, vitamines) pour l'alimentation des hommes et des animaux (Anne et Christian, 2015).

3.1. Classification

La famille des légumineuses (Fabaceae ou Leguminosae) se situe au troisième rang d'importance dans le règne végétal; elle regroupe plus de 18860 espèces d'eudicotylédones, plantes herbacées, arbustes, arbres ou lianes, rencontrées dans le monde entier (Murray, 2008).

Rassemblent toute une série d'espèces alimentaires, médicinales, industrielles, ornementales et horticoles, souvent cultivées, dont les racines portent souvent des nodosités à bactéries fixant l'azote (Dietrich *et al*, 2009).

Trois sous-familles sont définies, et parfois élevées au rang de famille:

Les *Mimosoideae* : à fleurs actinomorphes et de distribution principalement tropicale, avec 3000 espèces.(Martin, 2014). Sont regroupés en 77 genres et sont nodulés à plus de 90% (Soussou, 2013).

Les *Caesalpinoideae*: à fleurs zygomorphes, les pétales latéraux couvrant l'étendard dans le bouton, et de distribution surtout tropicale (150 genres et environ 3000 espèces) (Martin, 2014).

Parmi les espèces de *Caesalpinoideae*, seulement 23% ont été décrites comme étant capables d'être nodulées (Soussou, 2013).

Les *Papilionoideae* : constituent la plus grande sous-famille des *Fabaceae* , 97% parmi les espèces testées sont nodulées (Soussou, 2013). Fleurs zygomorphes, pétales latéraux entourés par l'étendard dans le bouton (430 genres et 12000 espèces). (Martin, 2014).

1. Légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L.

4.1 Définition

Le fenugrec scientifiquement connu sous le nom de *Trigonella* appartient à la sous-famille des *Papilionaceae* de la famille des légumineuses, *Trigonella* qui vient du latin « *trigonum* » signifiant trigone/triangle, se référant probablement à la forme triangulaire des fleurs (Villupanoor *et al* ,2008).

4.2 Origine

Le fenugrec est répandu autour du bassin méditerranéen et sur la côte ouest de la mer Noire. Sa présence et son utilisation sont anciennes aux Indes, en Chine méridionale, au Moyen-Orient et d'Égypte en Éthiopie. Il est cultivé en Afrique du Nord (Tunisie), en Ukraine, en Inde et en Chine (Witchl et Anton, 2003).

4.3 Description botanique

Plante herbacée annuelle, poilue ou glabre selon les variétés peut atteindre 50 cm de haut à tige dressée, rameuse, feuilles trifoliées (trois folioles), à folioles denticulées (Ghedira *et al*, 2010) (Figure 3).

Le fruit est une gousse allongée, longue de 7-10 cm, pouvant atteindre 20 cm. Graines sub-lisses très dures aplaties, mesurant 3 à 5 mm de long et 2 à 3 mm de large de couleur brun clair à brun rougatre, fleurs axillaires, solitaires ou groupées par deux,

de type papilionacé, de forme triangulaire (d'où le nom de trigonelle) blanchâtres de 12-15mm de long(Figure3) (Ghedira *et al* ,2010; Miara *et al* ,2013).

Les feuilles contiennent 89% d'eau, 6% de glucides, 4% de protéines et moins de 1% de lipides, ils sont aussi riches en minéraux, Calcium 40% , Fer 15% , et le Phosphore 7%

Les graines contiennent 45-60% de glucides, 30% de fibres solubles et 20% insolubles, 20-30% de protéines, 5-10% d'huile. Elles sont une bonne source de Magnésium , Fer , de Phosphore et vitamines (Mahbub *et al*,2018).

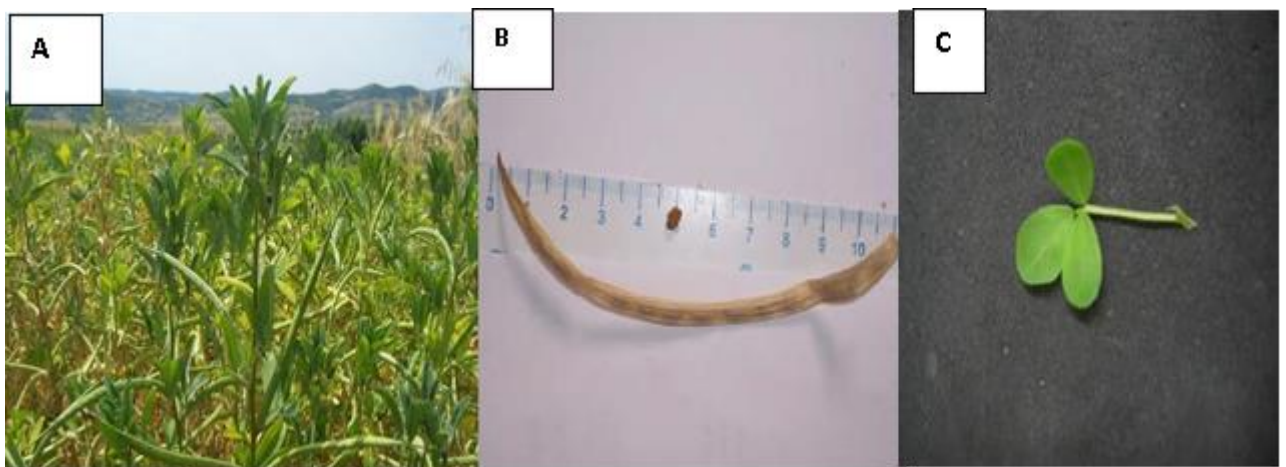


Figure 3 : (A):la plante *Trigonella*, (B): gousse, (C): feuille.

4.4 Les principaux constituants de la plante

Le fenugrec est une plante d'une grande qualité nutritive .Les graines sont d'une composition hétérogène de substances variées et renferment : les alcaloïdes (trigonelline,choline),des flavonoïdes (Ahmadinani *et al* ;2001) les principaux constituants sont résumés en Tableau 1

Tableau 1 : Principaux constituants chimiques de *Trigonella foenum-gracum*.(Mahbubet *et al* 2018).

Alcaloïdes	Acides aminés	Flavonoïdes	Fibres	Autres
Triméthylamine	Isoleucine	Rutoside	neutre	Coumarine
Trigonelline	4-hydroxyisoleucine	Quercétine	détérgent	Lipides
Neurin	Histidine	Vetixine	fibre	Vitamines
Gentianine	Leucine	Isovetixine	Minéraux	
Carpaine	Lysine		28% mucilages	
Choline	1-tryptophane		22% protéines	
Bétaine	Arginine		Huiles fixes	

4.5 Activités pharmacologiques

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été attribués à la consommation de fenugrec parmi ces effets on cite :

4.6 Activité anti-diabétique

Le fenugrec contribue à stabiliser la glycémie en manifestant une action inhibitrice sur les enzymes qui génèrent le glucose au niveau du foie, notamment chez les diabétiques modérés. (Kumar *et al*, 2013) l'effet du fenugrec sur la glycémie pourrait être dû à la présence d'un acide aminé 4-hydroxy-isoleucine, qui agirait sur la sécrétion d'insuline, mais surtout aux fibres. Les feuilles auraient également un effet hypoglycémiant (Ghedira *et al*, 2010).

4.7 Activité anti-oxydante

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme (Desmier, 2016). Un certain nombre d'antioxydants d'origine végétale sont des flavonoïdes. Le traitement par la graine de *Trigonella* a démontré la restauration de l'activité altérée des enzymes antioxydants y compris superoxyde dismutase (SOD), glutathion réductase (GR), catalase et glutathion

peroxydase (GPx) dans les tissus comme le cœur, les muscles et le cerveau pendant le diabète. (Yadav et Baquer, 2014).

4.8 Activité anti-cancéreuse et anti tumorale

Plusieurs études sur les propriétés anticancéreuses de fenugrec ont été effectués et ont montré des résultats positifs .Les constituants chimiques de *Trigonella* qui possèdent l'activité anticancéreuse sont les phytoestrogènes et les saponines (Meenakshi *et al*, 2017).

Trigonella foenum-gracum contient aussi d'autres composants bioactifs ayant une activité anticancéreuse et anti tumorale, la coumarine est un composé polyphénolique possédant une activité anti tumorale (Patil et Jain, 2014).

4.9 Activité anti-inflammatoire

Le fenugrec a été utilisé depuis longtemps comme un médicament traditionnel dans plusieurs pays comme l'Iran, Inde du sud et les pays d'Afrique comme un remède contre l'inflammation et ses effets. Les principaux constituants chimiques responsables de l'activité anti inflammatoire sont les alcaloïdes, saponines et flavonoïdes. Non seulement les graines qui ont une activité anti-inflammatoire mais aussi les feuilles (Meenakshi *et al*, 2017).

4.10 Activité hypocholestéromiante

Les graines de fenugrec réduit le cholestérol sérique, les triglycérides et les lipoprotéines. La consommation de fenugrec dans le régime alimentaire réduit l'accumulation de triglycérides dans le foie (Kumar *et al*, 2013).Les composants chimiques responsables de l'activité sont les saponines, spécifiquement diosgénine , galactomannane , et fibres (Meenakshi *et al* , 2017).

4.11 Utilisation traditionnelle

Les graines de *T. foenum-graecum* sont responsables de la plupart des propriétés médicinales. Elles ont été utilisées depuis des millénaires notamment en médecines traditionnelles arabo-islamique, chinoise et indienne (Oueslati et Ghedira ,2015).

Elle a servi à embaumer les momies, dans la Rome antique était utilisée pour aider l'accouchement. En Chine, les herboristes utilisaient ses graines pour traiter l'asthénie et favoriser la prise du poids (Patil et Jain, 2014 ; Oueslati et Ghedira 2015).

4.12 Classification taxonomique

Trigonella a une large diversité d'espèces ayant un potentiel économique, y compris *T.foenum-graecum* qui est la plus populaire espèce du genre par son innombrable utilisation et propriétés (Basu *et al*, 2019). Plus de 260 espèces de *trigonella* répartis dans le monde (Mahbub *et al*, 2018).

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous- famille : Faboideae

Tribu : Trifolieae

Genre : *Trigonella*

Espèce : *Trigonella foenum-gracum*.L

5. Rhizobium

5.1 Généralité

La première bactérie nodulant une légumineuse a été isolée en 1888 par Beijerinck, et initialement nommée *Bacillus radicola*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

Une bactérie communément appelée « rhizobium » (du grec rhiza : racine et bios : vie) (Soussou, 2013). Le premier critère pour l'existence du genre *Rhizobium* est leur capacité d'envahir les racines des plantes légumineuses et de stimuler la production des nodules. Le prestige de ces bactéries dans l'agriculture est expliqué par leur aptitude d'entrer dans un rapport symbiotique avec la plante hôte appropriée pour la fixation de l'azote atmosphérique (Allen et Allen, 1950).

5.2 Caractères généraux

Les rhizobia sont des bactéries à Gram négatif non sporulant, aérobies de 1,2 à 3µm de longueur et de 0,5 à 0,9 de largeur, chimioorganotrophes, neutrophiles (pH entre 6 et 7) et mésophiles (température optimale de croissance est entre 25 et 30°C), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien par deux à six flagelles péritriches (Somasegaran et Hoben , 1994).

5.3 Caractères symbiotiques

Les critères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée. L'infectivité des rhizobia exprime le pouvoir de la bactérie à noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées. (El hilali, 2006)

5.4 Caractères cultureux et biochimiques

5.4.1 Caractères cultureux

Sur le milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar), les rhizobia forment des colonies circulaires bombées, aqueuses, translucides, laiteuses ou blanches opaques, productrices d'EPS (Somasegaran et Hoben 1994).

5.4.2 Caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries aérobies ayant un système respiratoire où l'oxygène est l'accepteur final d'électrons. Les rhizobia produisent de grandes quantités d'éléments extracellulaires (EPS) et également les lipopolysaccharides constitutives de la membrane externe et qui interviennent aussi aux différentes étapes de l'infection (Somasegaran et Hoben 1994).

5.5 Classification

La nomenclature des espèces de *Rhizobium* était à l'origine formée par la conviction qu'une classification naturelle pourrait être basée sur la spécificité de la gamme de plantes symbiotiques de souches et espèces bactériennes (Young *et al*, 2001).

Les Rhizobia sont diverses et au cours des dernières années leur classification a connu de grands changements due aux nouvelles données phylogénétiques et polyphasiques menant à la description de nouveaux taxons (Young et Haukka, 1996). C'est un domaine en pleine croissance parce que de plus en plus les rhizobia sont isolés et caractérisés chaque jour surtout les zones tropicales et la Méditerranée (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Les premières classifications de rhizobia étaient fondées sur les tests de l'inoculation cross, les espèces étaient aussi classifiées en deux groupes : souches qui ont une croissance rapide et des souches qui ont une croissance lente, sur la base de leur temps de génération et le taux de croissance dans le milieu de culture (Rao *et al*, 2018). Puis (Zakhia *et al*, 2004) ont proposé le terme BNL (bactérie nodulante des légumineuses) pour éviter toute confusion entre le genre nommé *Rhizobium* et le terme générale de bactéries nodulantes (Zakhia *et al*, 2004) (Tableau 2).

Il est intéressant de noter que dans un même genre bactérien, il est possible de

trouver à la fois des bactéries nodulantes et non-nodulantes (Masson-Boivin *et al*, 2009). Aujourd'hui, il est possible de créer des rhizobia non-nodulants grâce aux avancées génétiques, en mutant chez un rhizobia sauvage et fixateur d'azote, des gènes essentiels au fonctionnement de la fixation d'azote, tel que le gène nifH (Westhoek *et al*, 2017).

Tableau 2 : classification actuelle des rhizobia. (Shamseeldin *et al*, 2017).

Souches Rhizobium	Plantes hôtes
Classe : α- Proteobacteria	Différentes plantes hôtes, pois, trèfle, lupin, soja, lotus, phaseolus, astragale, pois- chiches, sesbania, medicago, mimosa, indigofera, hedysarum, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Sphaerophysa, Oxytropis, Mung bean, Vigna, Rosa, Leucaena.
Ordre : Rhizobiales	
Famille : Rhizobiaceae	
Genre : <i>Rhizobium</i> (98) espèces	
Genre : <i>Ensifer</i> (21) espèces (anciennement <i>Sinorhizobium</i>)	Abrus, Lotus, Argyrolobium, Psoralea, Glycine, Sesbania, Acacia, Medicago, Prosopis, Kummerowia, Leucaena.
Genre : <i>Allorhizobium</i> (1) espèce	Neptunia
Genre : <i>Shinella</i>	Kummerowia
Genre : <i>Pararhizobium</i> (5) espèces	Tumeurs de fruits non symbiotiques
Famille : Phyllobacteriaceae	
Genre : <i>Mesorhizobium</i> (40) espèces	Différents hôtes, pois-chiches, lotus, astragale, sesbania, Prosopis, Albizzia, Biserrula, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora
Genre : <i>Phyllobacterium</i> (8) espèces	Lathyrus, Argyrolobium, Astragale, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora
Genre : <i>Aminobacter</i> (1) espèces	Anthyllis

Tableau 2 suite : classification actuelle des rhizobia. (Shamseeldin *et al*, 2017).

III famille Bradyrhizobiaceae	
Genre : <i>Bradyrhizobium</i> (37) espèces	Glycinec, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Pachyrhizus,dolique, Arachis, Cytisus, Retama, Aeshynomene, Acacia , Inga, Lupin, Phaesolus,niébé, Centrolobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus,
Genre : <i>Blastobacter</i> (2) espèces	Aeschynomene
Genre : <i>Photorhizobium</i> (1) espèces	Aeschynomene
IV Famille : Hyphomicrobiaceae	
Genre : <i>Devosia</i> (1) espèces	Neptunia
Genre : <i>Azorhizobium</i> (3) espèces	Sesbania
V famille Methylobacteriaceae	
Genre : <i>Methylobacterium</i> (3) espèces	Crotalaria, Trifolium,phyllosphère
Genre : <i>Microvirga</i> (4) espèces	Lupinus, Listia, niébé
VI famille Brucellaceae	
Genre : <i>Ochrobacterium</i> (2) espèces	Lupinus, Cytisi
Ordre Burkholderiales	
famille Burkholderiales	
Genre : <i>Burkholderia</i> (17) espèces	Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspalathus, Papilionoid, légumes
Genre : <i>Cupriavidus</i> (anciennement <i>Ralstonia</i>) (2) espèces	Mimosa, Phaselous, Leucaena

1 Etablissement de l'association symbiotique entre rhizobium et la plante légumineuse

6.1 Les signaux moléculaires

Les légumineuses représentent une famille de plantes capables de fixer l'azote atmosphérique par un processus de symbiose avec des bactéries du sol (*Rhizobium*). L'initiation de ce processus repose sur un échange de signaux chimiques (Palmier, 2002).

La plante sécrète dans le sol des flavonoïdes qui sont perçus par le rhizobium via une protéine régulatrice (NodD). Celle-ci déclenche l'expression des gènes *nod* (nod pour nodulation) aboutissant à la synthèse d'une molécule signal : le facteur Nod (FN) (Giraud, 2007).

6.2 Les gènes de nodulation

Les gènes *nod* codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse des facteurs *nod* et ils peuvent être classés en trois groupes : les gènes *nod* régulateurs, les gènes *nod* communs, et les gènes *nod* spécifiques (Skorupska *et al*, 2010).

6.2.1 Les gènes *nod* régulateurs (gène Nod D)

Ce gène est exprimé de façon constitutive et joue un rôle important dans la spécificité de l'hôte. Il code en effet pour une protéine qui serait le récepteur des flavonoïdes libéré par la plante. La protéine de gène *nodD* d'une espèce de *Rhizobium* donnée active l'expression des gènes *nod* dès qu'elle est au contact des flavonoïdes sécrétés par la légumineuse hôte (Cleyet-Marel *et al*, 1996).

6.2.2 Les gènes *nod* (A, B, et C)

Qui ont une structure très conservée chez la plupart des espèces bactériennes appartenant aux différents genres bactériens impliqués dans la symbiose fixatrice d'azote (Cleyet-Marel *et al*, 1996).

Ces gènes sont qualifiés des gènes communs Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont requis pour la synthèse du squelette de base du FN (Giraud, 2007).

6.2.3 Les gènes *nod* spécifiques

Sont responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base des FN. Ces gènes accessoires ne se retrouvent pas chez tous les rhizobiums et ils sont nécessaires pour la nodulation de certaines plantes. Chaque souche possédant son propre cortège de gènes *nod* spécifiques qui permettent la production d'un cocktail de FN (Long, 1996 ; Wais *et al*, 2002).

6.2.4 Les facteurs nod

Les facteurs Nod sont des signaux symbiotiques de nature lipochitooligosaccharidique produits par des Rhizobium (Gough, 2001), constitués d'un squelette d'oligochitine de 3 à 5 résidus de N-acétyl-glucosamine, acylé à l'extrémité non réductrice par un acide gras. La nature de l'acide gras (longueur et degré d'insaturation) et des substituants chimiques présents sur le squelette d'oligochitine sont caractéristiques d'une espèce bactérienne donnée et déterminent la spécificité d'interaction entre la bactérie et sa plante hôte (Dabellé *et al*, 2007).

6.3 Les étapes du nodulation

La constitution d'un nodule fonctionnel peut être divisée en 3 étapes et résumés dans (Figure 4).

6.3.1 Echange de signal d'infection

La bactérie et la plante mettent en place un système de (dialogue) basé sur un échange de molécules chimiques. Dans un premier temps, les racines excrètent des flavonoïdes qui attirent le Rhizobium dans le voisinage de la racine et activent les gènes bactériens *nod*, qui codent pour les facteurs de nodulation Nod. Ces facteurs, sécrétés par le *Rhizobium* (Jerome *et al*, 2004).

6.3.2 Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Dardanelli *et al*, 2003; Perry *et al*, 2004).

La rhicadhésine, est une protéine liant le calcium. Elle permet l'adhésion en complexant le calcium présent à la surface des racines. Des lectines sont également

impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Jerome *et al* ,2004).

Quand les facteurs Nod sont produits, ils induisent chez la plante des modifications morphologiques, physiologiques et moléculaires qui permettent la pénétration de la bactérie au sein de la plante hôte (Oldroyd *et al* , 2011). Conduisant alors à la formation des nodosités (Isabelle *et al* ,1995).Les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, déformée qui enferme les *Rhizobium* (Wais *et al* , 2002).

La paroi cellulaire végétale se modifie localement, la membrane cytoplasmique s'invagine et il se dépose du nouveau matériel végétal, ces modifications conduisant au développement d'une structure en forme de tube, remplie de bactérie, qu'on appelle filament infectieux. Ce filament infectieux grandit vers la base de la cellule constituant le poil radiculaire jusqu'à une région appelée le primordium. La division de ces cellules de racine donne finalement naissance au nodulation (Prescott *et al* ,2010).

6.3.3 Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane pér bacté rienne d'origine végétale (Oke et Long 1999 ; Day *et al* , 2001 ; Brewin, 2004 ; Gage, 2004). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires (Udvardi et Day, 1997). Au sein de primordium nodulaire, les bactéries se différencient en bactéroïdes, formes fixatrices d'azote adaptées aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule (Mergaert *et al* , 2006 ; Giraud, 2007).

Rappelons que la nitrogénase est très sensible à l'oxygène. Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments appelés leghémoglobine, synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Corbière, 2002). L'action de la leghémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Rasanen, 2002; Simms et Taylor, 2002).

Lors des stades tardifs de développement du nodule, les gènes *nif* et *fix* du *Rhizobium* sont actives (William G .Hpkins, 2003).

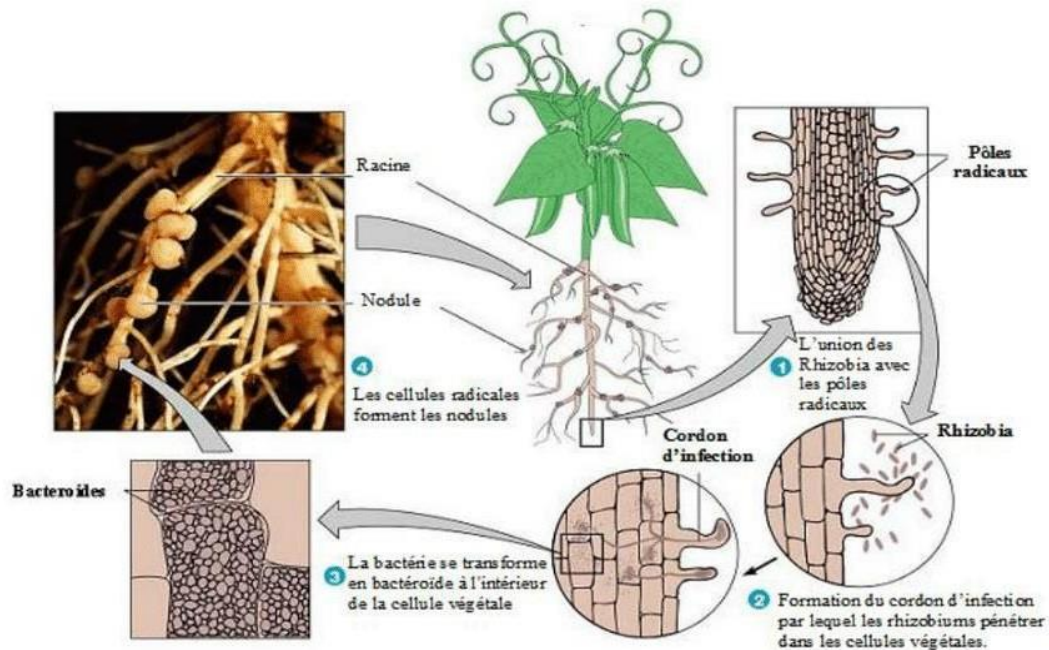


Figure 4 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse (Faghire, 2012).

6.4 Les gènes *nif* et les gènes *fix*

6.4.1. 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 *et al*, 2009).

6.4.2. Les gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Brewin, 1991 ; Hopkins, 2003).

Matériel Et Méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodules ont été prélevés à partir des racines de la plante *Trigonella foenum-gracum* L qui a été cultivée dans deux régions de l'Est Algérien sur les conditions climatiques et pédologiques.

Les échantillons cultivés dans la région Amira Arresse wilaya de Mila (43) (latitude 36°27'N et longitude 6° 15' 52''E) et commune de Tamalousse wilaya de Skikda (21) latitude 36°50' 32.28''N et longitude 6°40'35''E). (Carte1).



Carte 1 : localisation géographique de la zone de prélèvement (Chabbi, 2010).

1.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir des racines de la légumineuses *T.foenum- gracum* (fenugrec).

La collecte est faite selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Cette méthode consiste en premier lieu à creuser à 15cm autour de la plante et à une profondeur de 20cm, l'objectif de cette étape est de prélever la plante entière sans endommager son appareil racinaire, la deuxième étape consiste à extraire délicatement le bloc de sol et enlever manuellement la terre liée aux racines en faisant attention à ne pas tirer dessus (surtout les racines secondaires qui portent souvent beaucoup de nodules) après, placer la plante dans un sachet en plastique pour la transporter au niveau de laboratoire (Figure 5) .



Figure 5 : plante extraite avec son appareil racinaire

En dernier lieu, rincer délicatement les racines sous un courant d'eau des restes de la terre puis sécher au papier absorbant.

À l'aide d'un bistouri, les nodules doivent être détachés à 1 ou 2 mm du site d'attache, ceci pour les maintenir intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables de bactéries. Après cela ils sont prêts à la conservation.

1.2 Conservation des nodules

Pour une courte conservation et une utilisation immédiate, les nodules frais sont mis dans le réfrigérateur à 4°C à condition que le délai ne dépasse pas les 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 (CaCl_2 absorbe l'humidité).

La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du CaCl_2 ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules.

Le flacon est fermé hermétiquement et identifié d'une étiquette portant les informations suivantes : nom latin de la plante hôte (genre et espèce), date et lieu de prélèvement, date de conservation. (Figure 6).

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

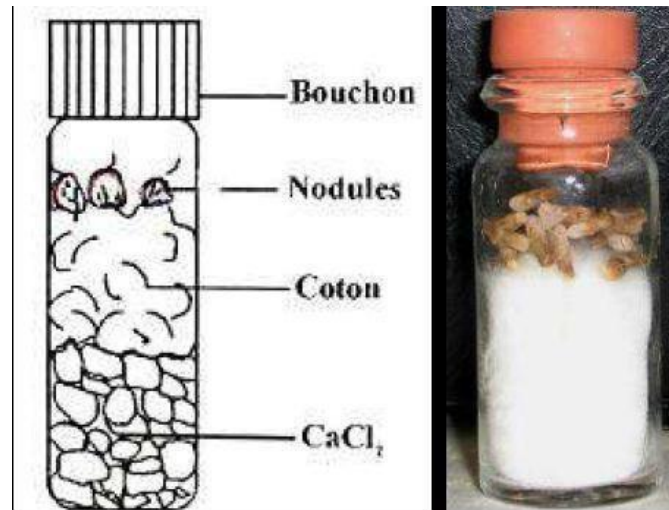


Figure 6 : Conservation des nodules.

1.3 Isolement des bactéries à partir des nodules

Les étapes d'isolement des *Rhizobium* sont celles décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles conservés au réfrigérateur sont laissés à température ambiante pendant une heure avant utilisation, et ceux conservés au CaCl_2 sont réhydratés toute une nuit dans l'eau distillée stérile à 4°C puis laissées pendant 1h à température ambiante.

1.4 Stérilisation des nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergée dans l'éthanol 95° Pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans l'hypochlorite de Calcium 3% pendant 3 minutes.

On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10ème rinçage.

1.5 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 flamage au bec Bunsen.

1.6 Isolement des souches

Avant l'écrasement et pour confirmer la stérilité des nodules on va étaler le nodule tel quel immédiatement sur des boîtes.

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de

platine, prélever la suspension de nodule et étaler selon la technique des quatre cadrans (Vincent,1970) (Figure 7).sur gélose coulé en boîte (YMA+RC et GPA), puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures.

Toutes ces manipulations se déroulent sous une hotte à flux laminaire, bien nettoyée avec de l'acide acétique, et exposée aux rayons UV pendant 20 minutes (ceci garantit des conditions d'asepsie totale), munie d'un bec Bunsen à proximité duquel se font les manipulations.

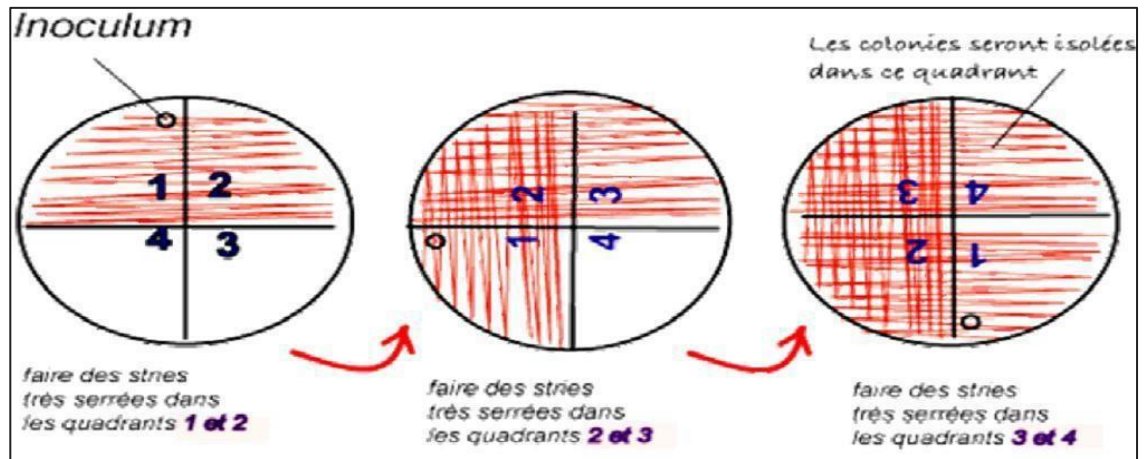


Figure 7: Ensemencement par la technique des quatre cadrans.

2. Caractères cultureux

2.1 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. (Annexe 1).

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).

2.2 Purification des isolats

Après l'isolement à partir des nodules, différents aspects de colonies peuvent être rencontrés sur les boîtes, ainsi différentes formes microscopiques peuvent être détectées. Dans ce cas, une série de repiquage est nécessaire pour avoir des souches pures.

Une colonie à purifier est transférée dans un tube à essais contenant 5 ml du milieu YMB (Annexe 1). Après incubation à 28°C dans un bain marie agitateur pendant 48 heures.

Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC et GPA+BCP.

Cette méthode de repiquage peut être répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

2.3 Vitesse de croissance

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, ...). Pour cela on cultive nos isolats sur milieu YMA + bleu de bromothymol (Annexe1).

Ce colorant étant un indicateur de pH mettant en évidence l'acidification du milieu par un virage de couleur au jaune. 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) (Figure 8).

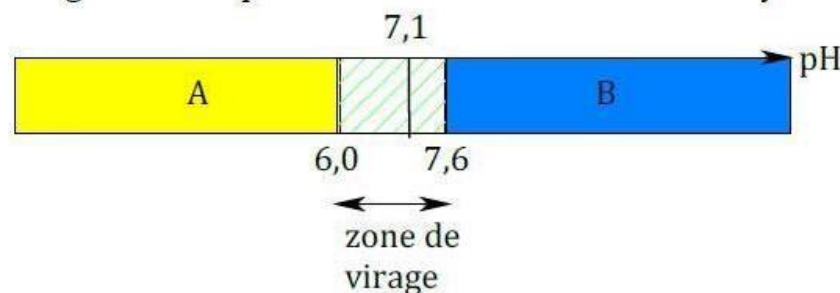


Figure 8: variation des couleurs de bleu de bromothymol.

2.4 Examens microscopiques et Macroscopiques

2.4.1. Examen microscopique

La coloration de Gram est celle qui permet de vérifier la pureté de la culture, déterminer la forme bactérienne et de différencier les bactéries Gram positif et bactéries

Gram négatif (Annexe 3).

2.4.2 Conservation des isolats

Après la vérification de leur pureté, les isolats utilisés dans notre étude sont ensemencés dans les tubes inclinés contenant le milieu YMA additionné de CaCO₃ (2 g/l) comme agent neutralisant l'acidité et incubé à 28° C pendant 3 jours.

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

3 Caractères phénotypiques

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

3.1 Tests biochimiques

L'objectif de ces tests est la recherche de quelques enzymes synthétisées par les bactéries qui jouent un rôle lors du processus d'infection.

3.1.1 Réduction de nitrates

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide Tryptone Yeast (TY) (Berniger, 1974). (Annexe2) contenant 0.1% KNO₃ (p/v) puis incubés pendant 4 jours sous agitation à 28°C.

Après incubation, on ajoute dans chaque tube 3-4 gouttes de chacun des réactifs nitrates-réductase I et II. La réaction positive se manifeste par une coloration rouge ou rose qui traduit la réduction de nitrates. L'absence de cette coloration nécessite l'addition d'une pincée de poudre de zinc et l'observation après quelques minutes de la teinte obtenue.

3.1.2 Hydrolyse de l'urée

Les souches sont cultivés sur milieu YMA contenant 2%(p/v) d'urée et 0.012 g/l de rouge de phénol (indicateur de pH). La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0.2µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C sous la hotte à flux laminaire puis incubés à 28°C pendant 7 jours.

3.1.3Activité cellulolytique

L'enzyme Carboxy Methyl Cellulase appelé aussi CMCas est l'une des principales enzymes pouvant être impliqués dans la phase initiale du processus

d'infection (Bhat et Bhat, 1997 ; Hu *et al.*, 2007)

Les souches sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% de CMC pendant 5 jours.

Après incubation les boîtes sont rincées à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubés pendant 30 minutes à 28°C. La solution colorante est remplacée par une solution NaCl 1M et laissée pendant 30 minutes à température ambiante

Un halo jaune - orange entoure les colonies qui montrent une activité d'une endoglucanase indique la présence d'une cellulase.

3.1.4 Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives qui élimine le peroxyde d'hydrogène.

Une goutte d'H₂O₂ est placée sur une lame propre en présence de quelques colonies (Delarras 1998).

3.1.5 Recherche de l'oxydase

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral.

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.

3.2 Tests nutritionnels

Ces tests ont un objectif de mettre en évidence la capacité des souches à assimiler différents hydrates de carbone et différents acides aminés.

3.2.1 Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les souches ont été mises en culture sur le milieu YMA où le mannitol est remplacé par des sucres suivants : Glucose, Galactose, Maltose, Arabinose, Saccharose. En ensemençant les différents milieux et incubés à 28°C pendant 5 jours.

3.2.2 Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote

Les isolats sont cultivées sur milieux défini 8 (Vincent, 1970) (Annexe 2) où le Glutamate de sodium est remplacés par l'un des acides aminés suivants : Méthionine, Valine, Tyrosine, Alanine, Asparagine. Incubés à 28°C pendant 5 jours.

3.3 Tests physiologiques

Le but de ces tests est d'étudier la capacité des bactéries à résister aux conditions de la salinité, la température et le pH.

3.3.1 Effet de la température

Dans le but de déterminer la température maximale et optimale de la croissance, les isolats ont été cultivés sur milieux YMA et incubés à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C pendant 5 jours.

3.3.2 Tolérance au chlorure de sodium (NaCl)

Pour étudier la capacité des isolats à l'osmotolérance, les isolats sont cultivées sur milieu TY (Annexe1) avec différentes concentrations de NaCl (1%,2%,3%,5%,10%) (p/v). (85,5mM, 171mM, 342Mm, 513mM, 1710mM), incubés à 28°C pendant 48h puis on mesure la DO a 600nm.

3.3.3 Effet du pH

Les isolats sont cultivés dans des bouillons YMB ajustés à différents pH (4 ; 5 ; 6.8 ; 8 ; 9), incubés à 28°C pendant 48h puis on mesure la DO a 600nm.

Résultats et Discussion

1 Caractères cultureux

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires a permis d'obtenir une collection de 12 isolats présentés dans le tableau 3.1.

Tableau 3 : Les isolats utilisés dans cette étude.

Code des Souches	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Source
B4	Isolat	<i>T.foneum-gracum</i>	Tamalousse (Skikda)	Notre étude
B7(1)				
B7(2)				
B10				
B10*				
F1				
F5				
F5*				
M6			AmiraAress e (Mila)	Notre étude
M8				
2			Tamalous se (Skikda)	
7				

1.1 Croissance sur milieu YMA et sur milieu YMA+RC

Sur le milieu YMA les colonies sont incolores, crème claire qui a tendance à devenir plus foncé avec le temps et occasionnellement rose, circulaires a contour régulier, bombées (Figure 9), les isolats absorbent peu ou pas le rouge Congo (Figure10) ceci confirme la pureté des colonies. En présence des contaminants, les colonies absorbent le rouge Congo et apparaissent de couleur rouge.

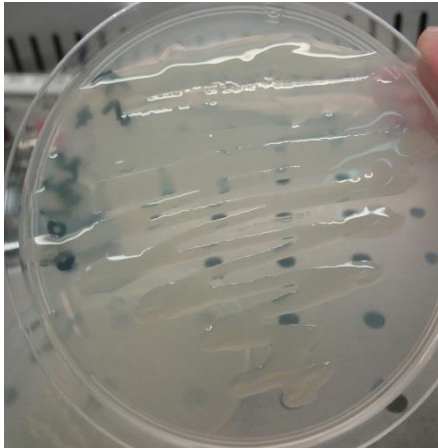


Figure 9: croissance sur milieu YMA YMA+RC.

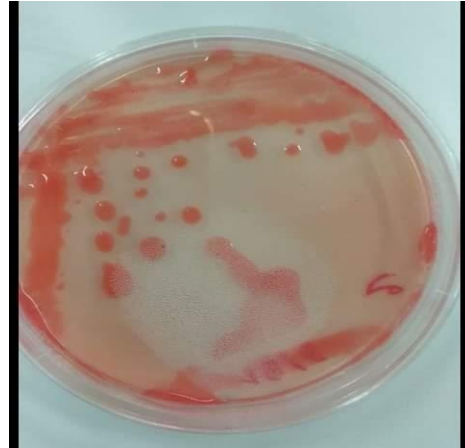


Figure 10 : croissance sur milieu YMA+RC.

Ces résultats ont été observés chez la majorité des *Rhizobia* étudiés par Vincent (1970) et Jordan (1984).

Ces mêmes caractères sont obtenus pour Singh et *al* (2008), l'analyse morphologique des *Rhizobium* isolés de *Trigonella foenum-gracum* L. a indiqué des colonies rondes de couleur blanche. Mêmes caractères sont trouvés par Berrada et *al* (2012), pour 110 souches isolées à partir de nodules racinaires de différentes légumineuses, la majorité des isolats avaient la même morphologie. Ils ont formé des colonies transparentes à crémeuses de 2 à 4 mm de diamètre après 1 à 3 jours d'incubation

1.2 Croissance sur le milieu GPA+BCP

Après 48h on observe un changement de couleur total vers le jaune (Figure 11) ce qui indique l'acidification du milieu par la majorité des isolats à l'exception des deux souches 2 et 7 dans lesquels le virage est observé au bout de 72h.

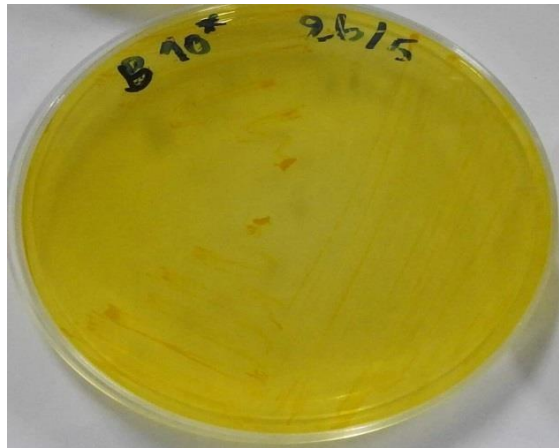


Figure 11 : Acidification du milieu GPA+BCP isolat B10*.

Il est bien connu que les rhizobia poussent faiblement ou pas du tout avec une faible variation de pH sur milieu GPA, bien que d'autres peuvent croître et acidifier le milieu (Vincent, 1970).

Dans une étude antérieure, il a été bien documenté que les rhizobia sont incapables de se développer sur le milieu GPA+BCP (Somasegaran et Hoben, 1994), mais il y a des études contredissent cette dernière, parmi ces études ceux de Demissie et *al* (2018) et Küçük et *al* (2006) qui ont trouvé que les espèces rhizobiennes peuvent aussi bien pousser sur ce milieu ce qui indique que les rhizobium peuvent utiliser le glucose contenant dans le milieu comme seule source de carbone.

Nos résultats ne sont pas en accord avec Mekasha et *al* (2015), qui ont trouvé que parmi les 16 souches isolées de la plante *Trigonella foenum-gracum* seules trois souches ont montré une faible croissance sur le milieu GPA.

Parmi 6 isolats des racines de pois (*Pisum sativum*), quatre souches ont montré une croissance modérée sur le milieu GPA, une a révélé une croissance médiocre et la dernière n'a pas poussée du tout sur ce dernier (Talukdar et *al*, 2008).

Mahaveer et *al* (2010), l'analyse des caractères des rhizobia isolés du Soja a montré sur 18 isolats à croissance rapide, 14 isolats présentaient une faible croissance ou pas de croissance sur le milieu GPA indiquant le caractère de rhizobia. Quatre isolats restants ont invariablement montré une croissance sur le milieu.

1.3. Vitesse de croissance

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984).

Dans notre cas, les isolats acidifient partiellement le milieu après 24h d'incubation, alors que dans 48h on observe l'acidification totale du milieu YMA+BTB (Figure 12) Ces résultats nous permis donc de les classer parmi les bactéries à croissance rapide.

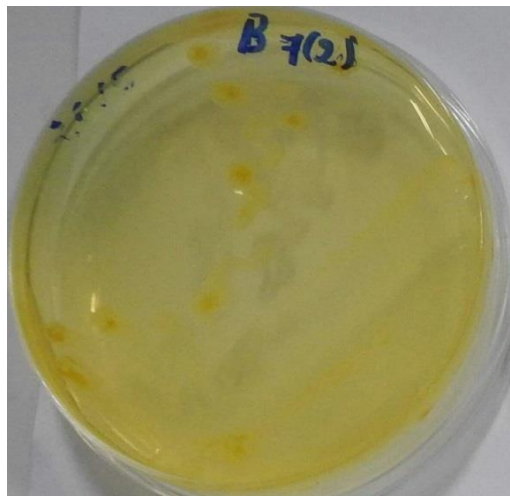


Figure 12 : Acidification du milieu YMA+BTB.

Nos résultats sont en accord avec Taluka et *al* (2008) et Koskey et *al* (2018), toutes les souches isolées du pois et toutes les souches isolées des racines de la fève ont changer la couleur du milieu du vert vers le jaune indiquant la production d'acide qui est l'une des caractères des souches rhizobiennes à croissance rapide.

Les travaux de Lyra et Silva (2013) sur les *Rhizobium* isolés d'arachide ont montré que parmi les 22 souches 82%, ont poussés dans 24h et les 18% dans 48h. Comme prévu pour les rhizobium à croissance rapide la plus part des isolats étudiés (91%) ont acidifié le milieu YMA+BTB.

D'autres travaux qui ont montré que les rhizobia à croissance rapide acidifient le milieu parmi ces travaux : ceux effectués par Kawaka et *al* (2014) sur les rhizobiums isolés du Soja, Kenasa et *al* (2014) sur les bactéries nodulant la féverole.

Demissie et al (2018), la majorité des isolats provenant des racines du pois-chiche (*Cicer arietinum L.*) produit une couleur jaune sur le milieu BTB.

2. Examen microscopique

L'observation microscopique à des différentes colonies bactériennes a montré que tous les isolats ont une forme de petits bâtonnets de couleur rose à Gram négatif (culture pure et homogène) (Figure13).

Singh et al (2008) et Irum et al (2009) trouvent que l'observation microscopique générale des isolats a montré qu'ils sont bâtonnets immobiles et Gram -.

(Meenakshi et al 2019), trouvent des bâtonnets courts, Gram-, non sporulés et mobiles.

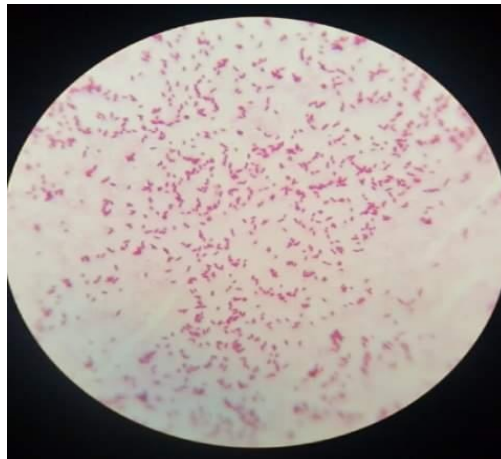
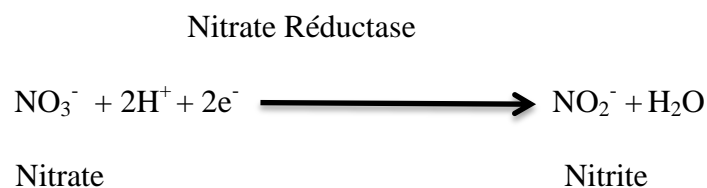


Figure 13 : Coloration de Gram observée sous microscope optique (GX100).

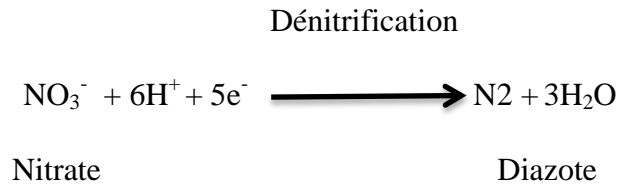
3. Tests biochimiques

3.1 Réduction des nitrates

Après l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs I et II de la nitrate réductase (réactifs de GRIESS) à la culture bactérienne, on observe un virage du couleur vers le rouge pour la souche F1, ceci signifie que la souche possède une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites, selon la réaction suivante :



Par contre Les isolats B4, B7(1), B7(2), B10, B10*, F5, F5*, M6, M8, 7 et 2 donnent une réaction négative (Figure 14) Nous avons donc ajouté de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase. On n'observe aucun changement de la couleur, le milieu est resté incolore indique que le stade nitrite et dépassé jusqu'au stade diazote (les isolats possèdent l'enzyme nitrate réductase, résultat positif) selon la réaction ci- dissous :



Ces résultats montrent que tous nos souches testées réduisent les nitrates en nitrites, suite à une activité de l'enzyme nitrate réductase.

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur 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, ainsi que la réduction dissimulatrice des nitrates, catalysée par le nitrate réductase, facilite la fonction symbiotique du bactéroïde.

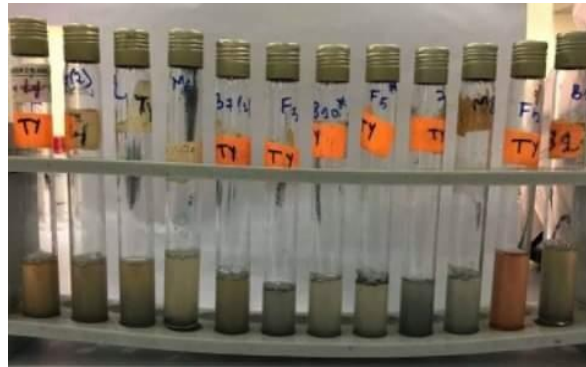


Figure 14 : Test de réduction de nitrate (+).

3.2 Hydrolyse de l'urée

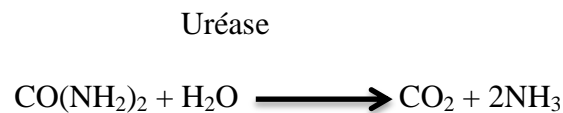
Après 7 jours d'incubation, la souche B4 a acidifié le milieu par changement de la couleur vers le jaune (Figure 14) ce qui indique l'absence de l'activité uréasique.

Mais les isolats B7(1), B7(2), B10, B10*, F1, F5, F5*, M6, M8, présentent une activité uréasique positive après 7 jours, les mêmes résultats obtenus par (Dekak, 2010) suite à une alcalinisation du milieu YMA additionnée d'urée et de rouge de phénol comme indicateur de pH. (Figure 15).

Les deux souches 2 et 7 donnent aussi une réaction positive mais juste après 48 heures.

L'augmentation du pH du milieu de culture suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rose. Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998).

L'urée est catalysée par l'uréase et produit le dioxyde de carbone (CO₂) et l'ammoniac (NH₃) selon l'équation :



L'enzyme peut être «constitutive », c'est-à-dire présente dans la bactérie indépendamment de celle de l'urée : l'enzyme révélée rapidement. Pour d'autre bactérie, la synthèse est induite par l'urée et la révélation peut donc demandée plus de temps (Joffin *et al*, 2006). C'est le cas pour nos souches qui ont met du temps pour synthétiser l'enzyme.

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



Figure 14 : Test uréase négatif.

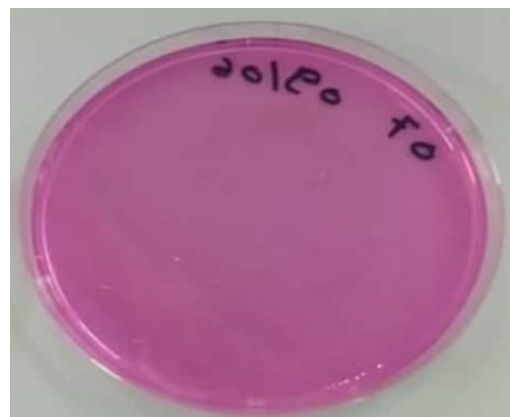


Figure 15 : Test uréase positif.

3.3 Activité cellulolytique

L'hydrolyse de carboxy-méthyl-cellulose (le composant fondamental de la paroi végétale) se manifeste par un halo jaune orangé autour des colonies.

Tous nos isolats ont montré une activité cellulolytique positive, (Figure 16) donc ces bactéries ont la capacité de dégrader la cellulose par la cellulase (endoglucanase).

Les espèces de *Rhizobium* sont connues pour produire des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques pouvant dégrader les liaisons glycosidiques présentes dans la paroi des cellules végétales, et ces enzymes sont essentiels pour l'infection initial des racines hôte de légumineuses (Shengwei et al, 2012), facilite aux *Rhizobium* de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et al, 1992).

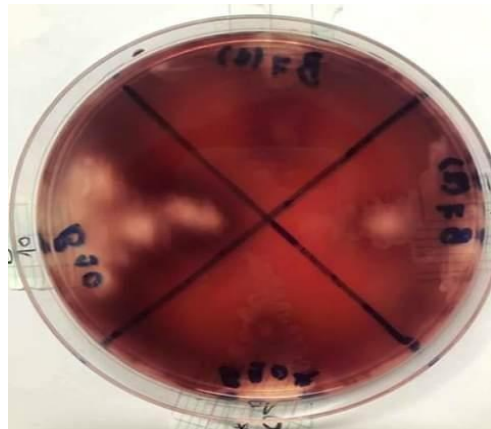


Figure 16 : Test de cellulase positif

Nos résultats sont en accord avec José et al, (2001) qui confirment la présence de l'activité cellulolytique chez toutes les microsymbiontes appartenant au *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ; (Howieson et al, 2016) ont montré que l'activité cellulolytique dépend de l'origine de la souche et de la composition des milieux de culture.

En effet, cette enzyme peut aider certaines rhizobactéries notamment *Rhizobium* à pénétrer plus facilement dans l'espace intercellulaire de la cellule racinaire et induire l'infection symbiotique des racines de légumineuses (Robledo et al, 2012).

3.4 Recherche de la catalase

La catalase c'est une Enzyme qui stimule la décomposition de l'eau oxygénée (H₂O₂) en oxygène et en eau, selon l'équation :



Les isolats B4, B7(1), B7(2), B10, B10*, F1, F5, F5*, M6, M8, produisent une effervescence au contact avec l'eau oxygénée (dégagement d'oxygène), ceci signifie que nos isolats possèdent l'enzyme catalase, les mêmes résultats obtenus par (Buminang et babalola, 2014). Ils ont dit que l'activité de la catalase est importante pour les bactéries, car elle aide les bactéries à se protéger contre le peroxyde d'hydrogène.

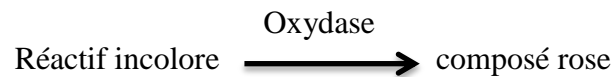
Par contre les souches 2 et 7 donnent une réaction négative (absence de la catalase).

Selon (Vincent, 1981), la présence de la catalase est l'une des caractéristiques principale des souches de *Rhizobium*. (Cheriet, 2016) a montré que la catalase est un enzyme qui joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les radicaux libre toxique qui son généré en particulier sous stress environnementaux.

3.5 Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase présent un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries a Gram (-)

Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée (rose violacé), par l'enzyme oxydase.



Tous nos isolats étudiés sont oxydase négatif, à l'exception des souches 2 et 7 qui sont oxydase positif ceci indique la présence de l'enzyme oxydase chez ces derniers, mais les autres isolats elles ne possèdent pas cette enzyme (Figure 17).

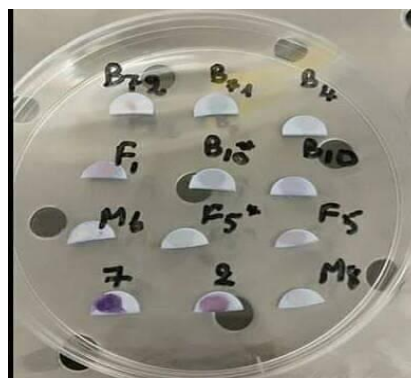


Figure 17 : Test d'oxydase.

4 Tests nutritionnels

4.1 Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les résultats obtenus montrent que nos isolats sont capables d'utiliser les sucres comme seule source de carbone mais avec une différenciation entre l'un et l'autre. (Tableau 4).

Une très faible croissance est observée en présence d'Arabinose, alors qu'en présence de Glucose, Maltose, Galactose et Saccharose une bonne croissance est observée chez la majorité des souches testées (Figure 18).

Les deux souches 2 et 7 montrent une absence de croissance en présence de tous les sucres testés à l'exception du Saccharose.

Le comportement des rhizobiums vis-à-vis du carbone diffère d'une espèce à une autre (Allen et Allen, 1950).

Plusieurs études ultérieures ont indiqué que les rhizobiums montrent une bonne croissance par l'utilisation préférentielle des disaccharides. Cet aspect a permis à Jordan (1984) de faire la distinction entre les deux genres établis à l'époque, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Les bactéries du genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono- et les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyalcools. A l'opposé, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985).

Les résultats obtenus dans cette étude, sont confirmatifs avec ceux de (Meenakshi et al, 2019) qui trouvent que les isolats de la plante *Dalbergia sissoo* sont capables de fermenter Saccharose, Galactose, Maltose. Sont aussi en accord avec les résultats de (Chabbi, 2010) qui a montré que le saccharose est le sucre le mieux assimilé par toutes les souches.

La plus part des souches rhizobiennes de pois-chiche de Maatallah et al (2002), ont pu cataboliser une grande variété de substrats carbonés, tous les isolats se sont développés sur : le D-Fructose, le Mannitol, Saccharose, Maltose, Sorbitol.

Degefu et al (2018), ce qui concerne l'utilisation des sources de carbone, il n'y avait qu'une légère différence entre les isolats de la plante (*Cajanus cajan* L. Mill sp.). Tous les isolats ont pu se développer sur les 17 sources de carbone fournies, tandis que 88% des isolats utilisaient l'arabinose.

Nos résultats sont semblables à ceux de Küçük et *al*, 2006, ont trouvé que tous les isolats de la Soja ont pu croître dans la présence de : Fructose, Galactose, Glucose, Mannitol, Saccharose.

Les tests d'utilisation des sucres ont montré que les rhizobiums isolés des racines des arbres légumineuses sont capables d'assimiler plusieurs carbohydrates comme seule source de carbone. (Shetta et *al*, 2011).

Tableau 4 : Assimilation des sources de carbone par les souches testées.

Souche \ Sucres	Glucose	Galactose	Maltose	Saccharose	Arabinose
B4	++	+	+/-	++	+
B7(1)	++	++	++	++	+/-
B7(2)	++	+	+	++	+
B10	++	++	++	++	+/-
B10*	++	++	+/-	++	+
F1	++	++	+	++	+
F5	++	++	++	++	+/-
F5*	++	++	+	++	+
M6	++	++	++	++	+/-
M8	+/-	++	+	++	+
2	-	-	-	+	-
7	-	-	-	+	-

(++) : bonne croissance (+) : faible croissance (+/-) : très faible croissance (-) : absence de croissance.

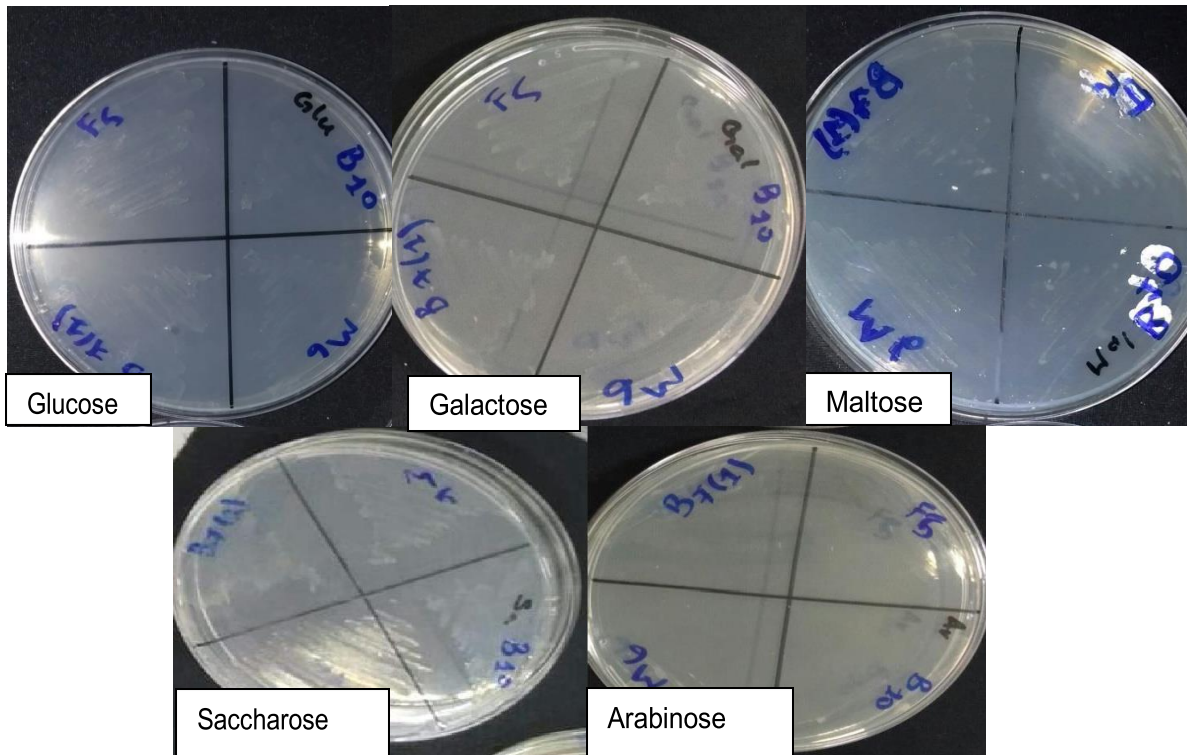


Figure 18: Assimilation de sources de carbone par les souches testées.

4.2 Utilisation des acides aminés comme source d'azote

La croissance des isolats sur milieu défini 8 en présence des différents acides aminés est variable selon la source d'azote (Tableau 5).

Toutes les souches assimilent beaucoup plus le Glutamate et l'Asparagine, alors que pour les autres acides aminés : Méthionine, Tyrosine, Alanine et Valine on note aucune croissance (Figure 19).

La capacité des isolats testés à utiliser une large gamme d'acides aminés comme seule source d'azote est considérée comme un critère de sélection des bactéries pouvant survivre et croître dans les environnements où les sources d'azote constituent un facteur limitant. (Demissie et al, 2018).

Chabbi (2010) a trouvé que la majorité des souches n'utilisent pas la Thréonine et la Phénylalanine, par contre l'Alanine, l'Asparagine et le Cystéine sont les acides aminés les mieux assimilés par toutes les souches étudiées.

Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984). Cependant, l'Histidine et l'Alanine peuvent être les acides aminés les plus assimilés (Liu et al, 2005).

Alors que les résultats obtenus dans cette étude ne sont pas en accord avec ceux de Degefu et al (2018) qui ont trouvés que la plus part des acides aminés sont utilisés par 95% des isolats, cependant l'acide aminé le plus sélectif était le Glycine et D-

sérine. Parmi 116 isolats testés seules 13 souches présentent une croissance dans Glycine et 10 ont utilisés D-sérine comme seule source d'azote.

Tableau 5 : assimilation de source d'azotes par les isolats.

AA Souches	Glutamate Na	Valine	Asparagine	Méthionine	Tyrosine	Alanine
B4	++	-	++	-	-	-
B7(1)	++	-	++	-	-	-
B7(2)	++	-	++	-	-	-
B10	++	-	++	-	-	-
B10*	++	-	++	-	-	-
F1	++	+/-	++	+	-	+
F5	++	-	++	-	-	-
F5*	++	-	++	-	-	-
M6	++	-	++	-	-	-
M8	++	-	++	-	-	-
2	++	+/-	++	-	-	++
7	++	+/-	++	-	-	++

(AA) : acides aminés (++) : bonne croissance (+) : faible croissance (+/-) : très faible croissance (-) : absence de croissance



Figure 19: Croissance des isolats en présence de certains acides aminés.

5 Tests physiologiques

5.1 Effet de la température

Toutes les isolats montrent une très bonne croissance à 4°C sauf les souches 2 et 7 (Tableau 6) l'optimum de croissance est observé de 20°C jusqu'à 37°C, alors qu'en 45°C aucune croissance est observée pour toutes les souches (Figure 20).

Graham (1992) noté que la température optimale de croissance chez la plus part des rhizobia est de 28°C jusqu'à 31°C, avec de nombreux souches incapables de se développer au-dessus de 10°C ou à 37°C.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Meenakshi et *al*, 2019) qui montre que les isolats sont capables de croître à un intervalle de température de 20 à 35 °C et sont incapables de croître à 45°C.

El Hilali (2006), a montré que 95% des souches ont pu croître à une température de 4°C jusqu'à 38°C et peuvent même supporter une température de 42°C.

La température élevé a un effet inhibiteur sur l'adhésion des bactéries aux poils racinaires, d'autre part les basses températures peuvent aussi affecter la formation des nodules ou empêche totalement l'initiation de la nodulation (Alexandre et Oliveira, 2012).

Tableau 7 : Effet de la température sur la croissance des isolats.

Souches \ T	4°C	20°C	28°C	37°C	45°C
B4	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
B7(1)	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
B7(2)	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
B10	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
B10*	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
F1	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
F5	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
F5*	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
M6	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
M8	+++ (72h)	+++ (48h)	+++ (48h)	++ (48h)	-
2	-	+++ (48h)	+++ (48h)	+ (48h)	-
7	-	+++ (48h)	+++ (48h)	+ (48h)	-

(+++) : très bonne croissance (++) : bonne croissance (+) : faible croissance
 (-) : absence de croissance.

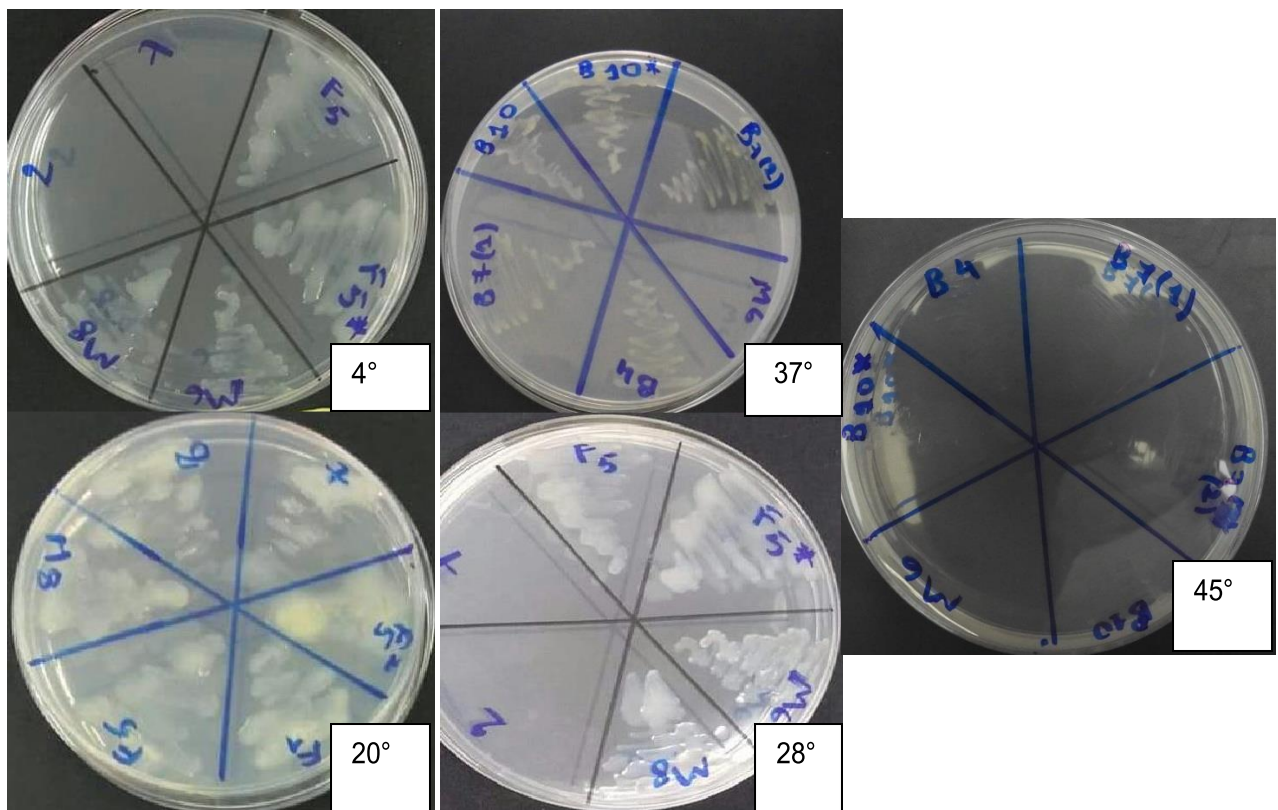


Figure 20 : Croissance des isolats sur différentes températures.

5.2 Tolérance en chlorure de sodium NaCl

Ce test est réalisé pour étudier la croissance des isolats en présence de différentes concentrations de NaCl.

Toutes les souches tolèrent des concentrations faibles en NaCl de 1% jusqu'à 3% avec un optimum de croissance à 1% pour les deux souches souche M6 et M8 ; 2% chez les souches B10 et B10* et 3% pour les souches B4, B7(1), B7(2), F1, F5, et 2 (Figure 21).

La tolérance à la salinité diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en sel (5% ; 10%) pour la totalité des souches.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Kaouadio et al, 2019) qui ont montré que les souches isolés de Soja ont présenté une grande tolérance au stress salin, et tous ces derniers poussaient dans la concentration 2%, mais ils ont trouvés qu'au-delà de cette concentration la tolérance des souches diminue rapidement.

Par contre nos résultats sont différents par rapport au (Chabbi, 2010) qui a montré que jusqu'à une salinité de 3% (513mM) de NaCl, la croissance des souches n'est pas affectée. A une concentration de 10% (1710mM) aucune croissance n'est observée pour la majorité des souches.

Pour Chen et al (2000) la croissance des rhizobia a été notée normale sous des concentrations en NaCl d'environ 1%. Certaines souches ont été rapportées pour leur capacité à croître à des concentrations élevées en sel (>3%), notamment *Sinorhizobium meliloti*.

La réponse des 15 isolats est semblable au pourcentage de NaCl allant de 0.5% à 3.5%. La croissance normale est observée de 0.5% à 1%, par la suite elle est diminuée avec l'augmentation de concentrations jusqu'à 3.5% avec une absence totale de croissance à 4% (Bhargava et al, 2016).

Merabet et al. (2006) ont mis en évidence *in vitro* une tolérance à une salinité allant jusqu'à 800mM de NaCl, chez des Rhizobia isolés de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* dans la sebkha de Misserghine (Oran), ils ont trouvés que tous les isolats bactériennes avaient une croissance normale dans la présence de 200 ou 400 mM de NaCl.

26 isolats ont toléré 600 mM, 12 parmi eux *S. meliloti*, 15 souches poussaient en concentrations allant jusqu'à 800Mm.

La salinité est un facteur majeur limitant la fixation symbiotique de l'azote. Elle affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol (Farissi et al, 2014).

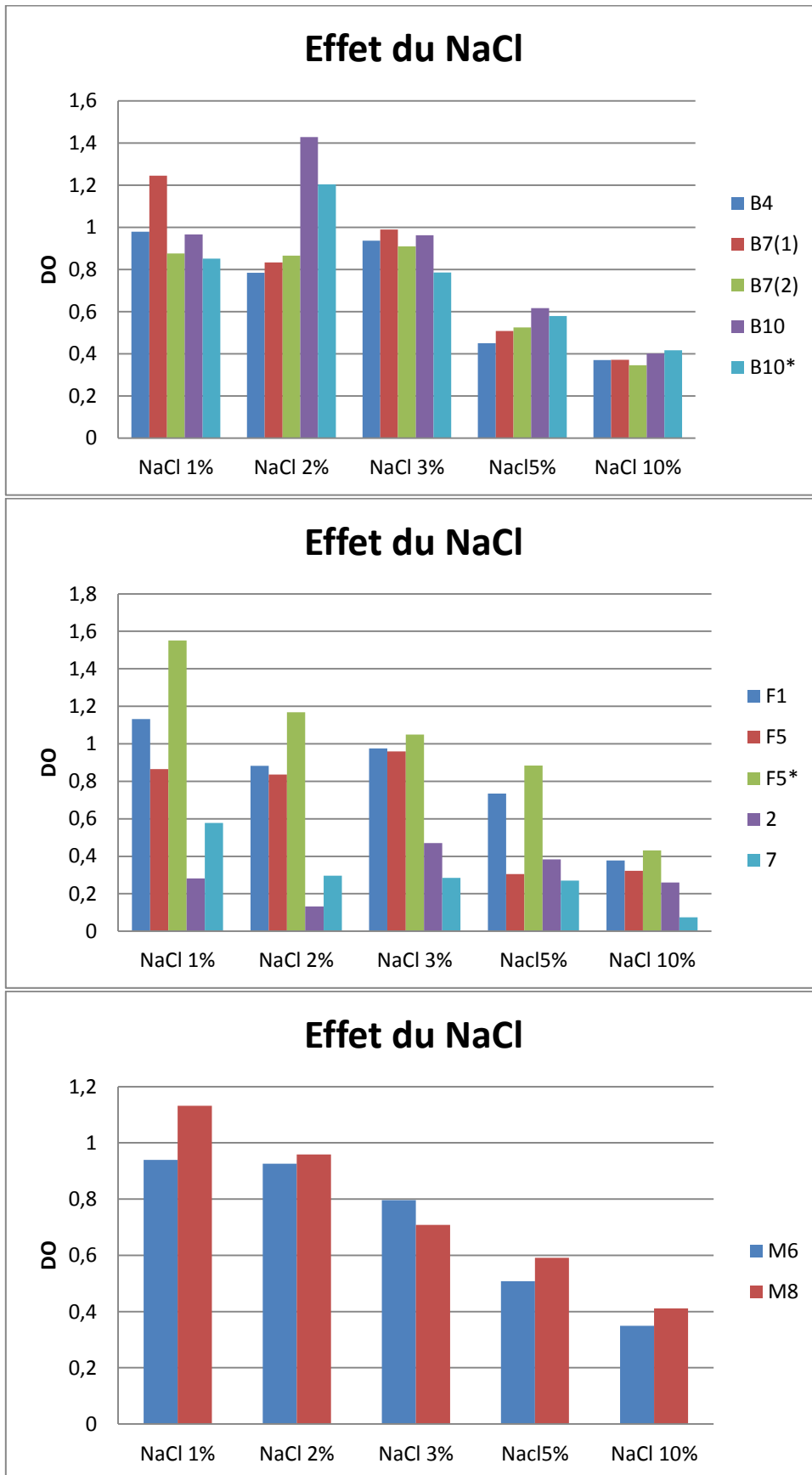


Figure 21 : Effet du NaCl sur la croissance des groupes de souches testées

5.3. Effet du pH

En générale les rhizobia sont des bactéries neutrophiles, cependant leur pH optimal de croissance peut varier (El Hilali, 2006).

Notons que le pH est l'un des facteurs majeurs limitant la survie et les propriétés symbiotiques des rhizobia dans le sol (Shetta et al. 2011).

La $DO_{\lambda 600}$ montre que dans l'ensemble, les souches testés tolèrent majoritairement les trois types de pH utilisé dans cette étude, pH acide (4,0 ; 5,0), neutre (6,8) et alcalin (8,0 ; 9,0) (Figure 22) avec un optimum de 5 à 6.8 pour la plus part des isolats, les souches 2 et 7 n'ont pas toléré le pH très acide 4 et 5.

Les résultats enregistrés sont en concordance avec celles de Dekak (2018), et Chabbi(2010), l'ensemble des isolats et des souches de références testées est capable de pousser entre pH3.5 et pH10.

Les résultats sont pareils avec ceux de Baba Arbi (2016) qui a trouvé que la quasi-totalité de ses isolats (97%) se sont développés aux pH compris entre 4.5 et 9 sauf une souche qui n'a pas toléré le pH acide inférieur à 5.5.

Alors que ces résultats ne sont pas en accord avec (Meenakshi et al, 2019) qui trouvent que les souches isolées de la plante *Dalbergia sissoo* (Sheesham) sont capables de croitre à un pH aillant de 5 jusqu'à 8, mais sont incapables de pousser au pH très acide 4 et pH très alcalin 9 et 10.

Keyser et Munns (1979) considèrent que la fourchette de pH acide critique pour la croissance des *Rhizobium* se situe entre pH 4 et pH 6.

L'acidité du sol provoque des troubles de la nutrition minérale, à la fois chez le rhizobium et chez la plante hôte (Skerman, 1982). Les rhizobia présentent différents mécanismes de tolérance aux pH extrêmes (Zahran, 1999).

Les mécanismes d'adaptation possibles comprennent la régulation du pH cytoplasmique: L'exclusion et/ou l'extrusion des protons, la production des exopolysaccharides et les changements d'hydrophobicité de la membrane plasmique. Ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu chez des rhizobia (Correa et Barneix, 1997).

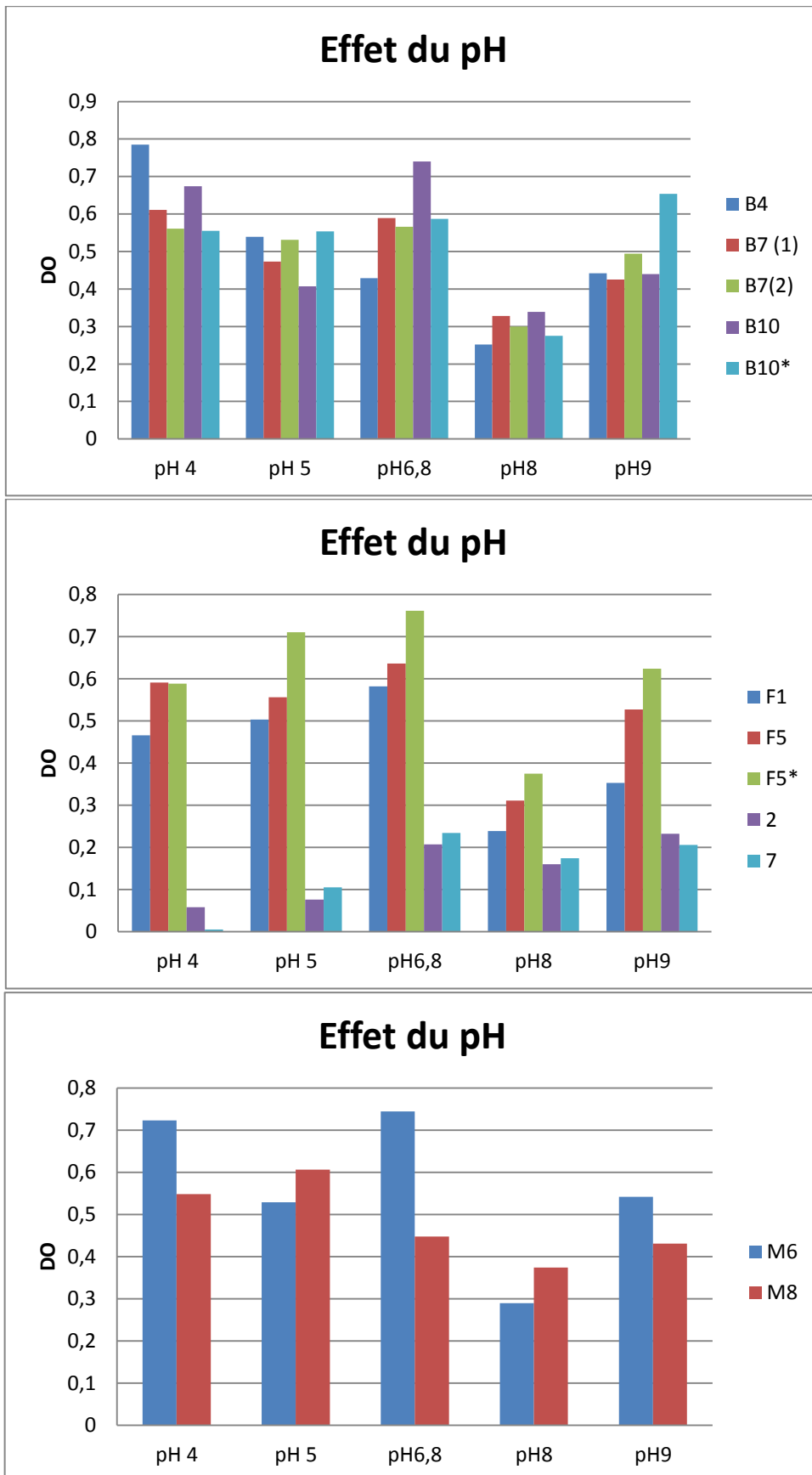


Figure 22 : Effet de différents pH sur la croissance des isolats.

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est l'identification phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L., cultivé dans deux régions de l'Est Algérien Mila et Skikda. Tout en suivant une démarche classique, celle appliquée par Vincent (1970, 1982), Somasegaran et Hoben (1994).

Cette recherche a permis la caractérisation phénotypique de 12 souches, une faible absorption de rouge de Congo sur le milieu YMA est observée, toutes les souches ont une croissance rapide avec acidification du milieu YMA additionnée de BTB, l'examen microscopique révèle des bâtonnets courts Gram négatif.

La totalité des isolats sécrètent les enzymes nécessaires au processus d'infection (cellulase) ou au métabolisme azoté (uréase, nitrate réductase), avec l'absence de l'oxydase chez la majorité. Par contre tous les isolats possèdent la catalase à l'exception des deux souches 2 et 7.

Les résultats des tests nutritionnels montrent une assimilation des carbohydrate comme source de carbone avec une différenciation entre l'un et l'autre, nos isolats n'assimilent pas les acides aminés sauf le Glutamate et l'Asparagine.

Les souches testée prouvent pousser dans un intervalle de température aillant de 4°C jusqu'à 37°C avec un optimal de croissance entre 20°C et 37°C, mais elles ne tolèrent pas la température 45°C.

Nos isolats sont des osmotolérantes et peuvent pousser dans une concentration de 10% de NaCl, aussi peuvent croitre dans des conditions très acides pH 4 comme des conditions alcalins pH 9

A travers des résultats obtenus, sur l'analyse phénotypique (la morphologie des colonies, vitesse de croissance, présence des enzymes spécifiques au processus de la nodulation, les facteurs abiotiques..) ont montré que l'ensemble des isolats présentent des caractères proche à des bactéries de genre *Rhizobium*.

Rhizobium est décrit comme une bactérie du sol qui a la capacité d'infecter la racine de légumineuses et pu induire la formation des nodules avec fixation ultérieure d'azote.

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plant 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.

-réalisation d'autres tests, notamment le test de nodulation, pour affiner l'analyse phénotypiques. Cette dernière doit être suivie dans une seconde étape par une caractérisation génétique et moléculaire basée sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, l'hybridation ADN/ADN, des gènes *Nod* et des gènes de ménage (*rec A*, *gln II*), ceci afin de bien situer la position taxonomique des microsymbiotes de la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L.

Références Bibliographiques

Ahmadiani, A., Jawan, M., Semniani, S., Barat, E., et Kamalinejad, M. (2001). Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Trigonella foenum-gracum* leaves extract in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* (75), pp283-286.

Alexandre, A., et Oliveira, S. (2012). Response to temperature stress in rhizobia. *critical reviews in microbiology*, 39 (3), pp219-228.

Allen, O. N., et Allen, E. K. (1950). biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia bacterial. *Rev*, 14:pp273-330.

Baba Arbi, S. (2016). Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt. thèse de Doctorat.

Barlier I., Miginiac E. (1995) Analyse de genes et de signaux bacteriens impliqués dans les étapes précoces de la symbiose rhizobium meliloti-medicago sativa. Thèse de doctorat. Paris.

Basu, S., Zandi, P., et Cetz al, I. (2019). Fenugreek *Trigonella foenum-gracum* L. The role of functional food security in global health, pp471-497.

Berlhet, J. (2006). Dictionnaire de biologie . (d. Boeck, Éd.) Belgique.

Berrada, H., et Fikri-Benbrahim, K. (2014). Taxonomy of rhizobia : current perspectives.

Berrada, H., Nouioui, J., Iraqui Houssaini, M., El Gachtouli, N., Gtari, M., et Benbrahim, K. (2012). phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. *African journal of microbiology research* vol 6(25), pp5314-5324.

Bhargava, Y., Murthy, J., kumar, T., et Rao, M. (2016). Phenotypic, stress tolerance and plant growth promoting characteristics of rhizobial isolates from selected wild legumes of semi arid region, tirupati, India. *Advances in microbiology* (6), pp1-12.

Brenvin, N. (2004). Plant cell wall remodeling in the Rhizobium-legume symbiosis. *Critical Review in Plant Sciences*, 23-pp293-316.

Brenvin, N. (1991). Development of the legume root module . *Annual Review of cell and Developmental Biology*, 7:pp191-226.

Chabbi, R. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella*

L.(Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. thèse de magister.

Chafi, M., et Bensoltane, A. (2009). *Vicia faha* (L) A Source of organic and biological Manure for the Algerian Acid Regions. World Journal of Agricultural Sciences 5(6), pp 689-706.

Chen , W., Lee, T., et Lan, C. (2000). Characterization of halotolerant Rhizobia isolated from root nodules of *Cnivalia rosea* from seaide areas. FEMS Microbio Eco 34, pp9-16.

Cheng, Q. (2008). perspectives in biological nitrogen fixation research. journal of integrative plant biology 50(7), pp786-798.

Corbière H.L.F.,2002 :The importance of sucrose synthase for AMsymbiosis in maiz,in pea and medicago.Thèse de doctorat.Andriankaja.

Correa, O., et Barneix, A. (1997). Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*.

Dardanelli M.,Angelini J.,Fabra A.,2003 :A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots.Canadian Journal of Microbiology 49 pp 399-405.

Day D.A.,Poole P.S.,Tyerman S.D.,Rosendahl.L.,2001 :Ammonia and amino acid transport across symbiotic membrane in nitrogen –fixing legume nodules,Cellular and Molecular Life Science.58 pp61-71.

Day, D., Poole, P., Tyerman, S., et Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, pp 61-71.

Debellé F.,Rosenberg CH .,Bono J.J.,2007 :calcium and *Nod* signaling .23 pp 130-132.

Degefu, T., Endalkachew, W., Makka , A., Asnake, F., Tilahum, A., et Ojiewo, C. (2018). morpholophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Mill sp) growing. Full length resarch paper vol 17(6), pp167-177.

Demissie, N., Degefu, T., Ergena , A., et Ojiewo, C. (2018). phenotypic characterisation of rhizobial and non-rhizobial isolates recovered from root nodules of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in Ethiopia. Afr.J.microbiol Res vol 12 (4).

- Divetrich. (2009).** plantes à risque. (T. e. inter, Éd.) Paris: Tec et Doc EM inter.
- Dixon , R., et Kahn , D. (2004).** genetic regulation of biological nitrogen fixation. nature reviews microbiology 2(8), pp621-631.
- Drouin, P. (1996).** caractérisation phénotypique et génotypiques et étude des mécanismes d'ataptation aux basses températures des souches *Rhizobium* isolées de *Lathyrus japonicus* et *Lathyrus pratensis*. Thèse pour l'obtention du grade de *Philosophiae Docteur* .
- Duhoux M., Nicol M.,2004 :**Biologie Végétale.Association et Interactions chez les plantes.DOUNOD.Efron.B.1979.Bootstrap methodes :an other look at the jackknif.annals of statistics.7 pp 1-26.
- El Hilali, I. (2006).** la symbiose *Rhizobium*-Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise une évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. thèse de doctorat.
- endoglucanase CelC₂ dans la biosynthèse de la cellulose et la formation de biofilm sur les racines des plantes et les surfaces abiotique. Usine de cellules microbiennes. 1475-2859.
- Faghire, M. (2012).** Rôle des micro organismes symbiotique (cas de *Rhizobia*) dans l'amelioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress Salin Thèse pour obtenir le grade de docteur. *Faculté des sciences et techeniques de Marrakesh*.
- FAO. (2006).** Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques,. *INRAA*.
- Farissi, M., Faghire, M., Aziz, F., Faghore, M., et Goulam, C. (2014).** Isolation and screening of rhizobiol straoins modullating alfalfa a for their toerance to some environnementak stresses . *PJAR* 2, pp9-19.
- Gage D.J.(2004)**infection and invasion of roots by symbiotic.nitrogrn-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes.Microbiologie and Moecular Biology Reviews.68 pp 280-300.
- Ghedira , K., Goetz, P., etLe Jeune, R. (2010).** Fenugrec: *Trigonella foenum-gracum*
- Giraud E.,2007 :**Symbiose *Rhizobium*-legumineuses :Au nouveau sésame.23(6-7) pp 663-666.
- Gough, C.(2001)**Rôle de calcium dans la signalisation cellulaire. Journal de la Société de Biologie.195(3) pp 297-302.

- Graham , P. (1992).** Stress tolerance in rhizobium and nodulation under adverse soil conditiond candian . *Journal of microbiology* 38 (6), pp475-484.
- Hoffman, B. M., Lukoyamov, D., Yang, Z., Dean, D. R., et Seefeldt, L. C. (2014).**
- Hopkins , W. (2003).** *Les plantes et l'azote in physiologie vegetale deuxieme edition de Boeck e Larciers.* de Boeck e Larciers.
- Howieson, J.G ., Dilworth, M.J. (2016).**Working wiht *Rhizobia* ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale pp 132.
- Irum , N., Asghari , B., et Ulhassan, T. (2009).** Morphological, biochemical and molecular chaarcterization of Rhizobia frome halophytes of Khewra salt range and attock. *Pak J Bot* 41(6), pp3159-3168.
- Jerome J, P. J. (2004).** *Microbiologie.* (Dumod, Éd.) Paris.
- José ,M., Igual, L., Vel Azquez, E., Mateos, P.F., Rodrequez-Barruecol, C., Cerventes EMartinez Molina, E. (2001) .** Cellulase isoenzymeprofiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups.
- Kaouadio, A., komate, I., De paul n'gbesso, M., Attien, Y., Fondio, L., Filali-maltouf, A., et al. (2019).** Phenotypic and symbiotic diversity of rhizobia isolated from root nodules of soybean [*Glycemie mosc (1) Merrill*] in côte d'ivoire. *Int .j.curro.microbiol app sci* 8 (3), pp766-774.
- Kawaka, D., Dida , M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., Osoro, N., et al. (2014).** symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Paseolus vulgaris* L.) in soil of wetern Kenya. *international scholarly research notices* , pp 1-8.
- Kenasa , G., Jida , M., et Fassil, A. (2014).** charcterization of phosphte solubilizing Faba bean (*Vicia faba* L.) nodulating rhizobia isolated from acidic soils of Wollega, Ethiopia. *Ethiopia.sci Technol Art Reo.J* 3(3), pp11-17.
- Keyzer, H., et Munns, D. (1979).** Tolerance of rrhizobia to acidity,aluminum and phosphate.
- koskey, G., Mburu, S., Klimiti, J., Ombori, O., Maingi, J., et Njeru, M. (2018).** genetic characterization and diversity of Rhizobium isolated from root nodules of Mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Frontiers in Microbiologie*, 9.

- Kucuk, C., Kivanc , M., et Kinaci, E. (2005).** characterization of Rhizobium sp isolated Bean *Turk.J.biol*, pp 127-132.
- Kulkarni, S., et Nautiyal, C. (1999).** Characterization of high temperature-tolerant rhizobia isolated from *Prosopis juliflora* grown in alkaline soil. *The journal of general and applied Microbiology*, 45(5), pp313-220.
- kumar, G. P., Anand, T., Singsit, D., Khanum, F., et Anil Akumar, K. (2013).** evulation of antioxidant and anti-fatigue properties of *Trigonella foenum-gracum* rats subjected to weight loaded forced swim test . *pharmacognosy journal* 5,pp 66-71.
- L.(Fabaceae ex.leguminosae):8. *Springer-Verlag*, 180-4.
- Liberat, L. P. (2015).** *Microbiologie*. (Dumod, Éd.) Paris.
- Liu, L., Mcbride, K., et Reich, N. (2005).** Stat 3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin alpha 3. *Proc natl acad sci USA* 102, pp8150-8155.
- Long S.R.,1996 :**Rhizobium symbiosis Nod factor in Prespective Plant Cell 8 pp 1885-1898.
- Lyra , M., et Silva , T. (2013).** phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogae* L.) grown in Brazilian Spodosols. *12 (17)*, pp 2147-2156.
- Mahaveer, P., Khushboo, S., et Suchil, K. (2010).** biochemical characterization and metbolic diversity of soyben rhizobia isolated from Malwa region of cenrtral India. *plant soil env* 56(8), pp375-383.
- Mahbub , J., Ahmed Mou, R., Ahmed Sikta, S., Rahman, A., et Ranjan Dash, P. (2018).** bioogical and medinal significance of *Trigonnella foenum-gracum*. *a review IJLSR; vol 4(2)*, 15-26.
- Marouf, A., et Reynaud, J. (2007).** *La botanique de A a Z 1662 definition*. (Dumod, Éd.) Paris: Dunod.
- Martin, P. (2014).** *Les familles des plantes a fleurs d'Europe botanique systematique et utililitaire 2e edition*. (P. u. Namur, Éd.) Belgique.
- Martingo, M. M. (2007).** Brock Biologie des microorganismes 11e edition (chap 17 Diverste metabolique). (P. Education, Éd.) Paris.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Penet, X., et Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legume :have many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* 17 :, pp458-466.

mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage . *chem.rev* .

Meenakshi, D., Vinay, K., Neerja, R., et Bhawna, D. (2019). Isolation and charecterizatin of rhizobium associated with root nodules of *Dalbergia sissoo*. *Int j curer microbiol app sci* 8(3), pp1910-1918.

Meenakshi, P., Singh, D., Kumar, N., et Kandpal, A. (2017). therapeutic significance of Fenugreek W.S.R its hypolipidic activity. *IJAPR* 5(7), pp58-62.

Mekasha, T., Fassil, A.,et Jemaneh, Z. (2015). Symbiotic and phenotypic characterization of Rhizobium isolates nodulating fenugreek (*Trigonella foenum-gracum L.*) from north and east Shewa, Ethiopia. *Int journal of Agri and Agi R* vol 7, n° 1, pp 93-104.

Merabet, C., Bekki, A., Benrabah, N., Baba-ahmed Bey, M., Bouchentouf, L., Ameziane, H. (2006). Distribution of Medicago species and their microsymbionts in a saline region of Algeria, arid land management. pp219-231.

Mergaert P., Uchiumi T.,Alunni B.,Evanno G.,Cheron A.,Catrice O.,Mausset A.E.,Barloy-Hubler F.,Galibert F.,Kondorosi A.,Kondorosi E.,2006 :Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.103 pp 5230-5235.

Miara, M. D., Ait Hammou, M., et Hadjaj Aoul, S. (2013). phétothrapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). *phétothérapie*, 11(4),pp 206-218.

Nabros, M. (2008). **Biologie vegetale strcuture fonctionnement ecologie et biotechnologie.**

Oke V., Long S.R.,1999 :Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiotic.Current Opinion in Microbiology.2 pp 641-646.

Oldroyd G.E.,Murray J.D.,Pool P.S.,Downie J.A.,2011 :The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis.Annuel Review of Genetics 45 pp 119-144.

Oueslati, A., et Ghédira, K. (2015). Notes ethnobotanique et phytopharmacologie sur

Trigonella foenum-gracum. *Trigonella foenum-gracum*. *Phytotérapie*.13: lavoisien, pp234-238.

Palit, s., et jain, g. (2014). Holistic approach of *Trigonella foenum gracum* in phytochemistry and pharmacology. *A review. curent trends in technology and science*. 3(1):, pp34-48.

Palmière S.,2002 :Symbiose Rhisobiaceés-légumineuses :études synthétiques des sondes moléculaires. Thèse de doctorat .Paris.

Perry J.J.,Stalex J.T.,Lory S.,2004 :Microbiologie cours et questions de revision.Edition. DOUNOD.Paris.France.

Pujik, P., et Normand, P. (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plante actinorhiziennes. *Biofuture* pp298, 26.

Rao, D., Mohanty, S., Acharya, C., et Atoliya. (2018). Rhizobial Taxonomy-currents status. *IUNFC*, No 3.

Rasanen L.,2002 :Biotic and abiotic factor infl uencing the development of N₂.Fixing symbiosis between rhizobia and the woody legumes *Acacia*.Thèse de doctorat .université de Helsinki.

Rene Heller, R. E. (2011). Physiologie vegetale 1 nutrition 6e edition. (Dumod, Éd.) France.

Riah, N., (2014). Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar viciae isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. thèse de doctorat.

Robledo M., Rivera, L. J., Jiménez-Zurdo, I., Rivas, R., Dzzo, F., Velázquez, E., Martinez-Molina, E., Hirsch, A.M., Mateos, P.F. (2012) . Rôle de *Rhizobium*

Shamseldim, A., Abdelkhalek, A., et Sadonsky, M. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic , nitrogen-fixing, legume, associating bacteria:. *A review*

Shetta, N., Shaharni, T., et Abdel-Aal, M. (2011). Identification and charecterization of rhizobium associated with woody legume trees grown under Saudy arabia condition. *Am J.agric environ sci* 10(3) ,pp 410-418.

- Simms E.L., Taylor D.L. (2002)** Partner choice in nitrogen-Fixation mutualismes of legume and Rhizobia 42 pp369-380.
- Singh , B., Ravneet, K., et Kashmir, S. (2008).** characterization of Rhizobium isolated from the root of *Trigonella foenum-gracum* (fenugreek). *African Journal of Biotechnology* vol 7 (20), pp3671-3676.
- Singleton, P. (2005).** *Bacteriologie pour la médecine labiologie 6e édition traduite de l'anglais par Jean Dusart.* (Dumod, Éd.)
- Skerman, P. (1982).** Les légumineuses fourragées tropicales. *Ed.fao.ROME*, 666. *soil sci soc am j43* , pp519-523.
- Somasegaran P.,Hoben H.J.,1994 :** Hndbook For Rhizobia.Springer-Verlag.Berlin.
- Somasegaran, P.,et Hoben, H. (1985).** Methods in Legume Rhizobium Technology. United States Agency for International Development. *USAID*.
- Somasegarn, P., et Hoben , H. (1994).** *Handbook for rhizobia.* New York: Springer verlage.
- Stowers , M. (1985).** carbon metabolism in rhizobium species. *An Rev Microbiol* 39, pp39- 108.
- Talukder, M., Solaiman , A., Khanam, D., et Golan Rabbani, M. (2008).** Characterization of some Rhizobium isolates and their effectiveness on pea. *Bangladesh J Microbio*, vol 25 n°1, pp 45-48.
- Taylor L.P.,Grotewold E 2005 :**Flavonoides as developmental regulators.Current Opinion in Plant Biology.8(3) pp 317-323.
- Udvardi M.K.,Day D.A.,1997 :** Matabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*.48 pp 493-523.
- Wais R.J.,Keating D.H.,Long S.R.,2002 :**Structure fonction analysis of Nod factor.Induced Rood hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis.*Plant Physiology* 129(1) pp 211-224.
- Witchl, M., et Anton , R. (2003).** plantes thérapeutiques. *EMI/Tec et doc*, pp216-9.
- Woolverton, P. H. (2010).** *Microbiologie.* (D. boeck, Éd.) Paris. *World j microbiol biotechnol* 13, pp153-157.

Yadav, C., et Najma Baquer, Z. (2014). pharmacological effects of *Trigonella foenu-gracum* in health and disease. *pharmaceutical biology* 52:2,pp 243-254.

Young, J., et Haukka, K. (1996). diversity and phylogeny of rhizobia. *new phytol* pp133, 87- 94.

Zahran, H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol mol biol rev* 63(4), pp968-989.

Zakhia , F., et De Lajudie , P. (2001). taxonomy of rhizobia. *Agronomie.EDP sciences* 21(6- 7).

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-mavel, J., Gillis, M., et al. (2004). Characterization of wild legume modulating Bacteria (LNB) in the infra-arid zone of tunisia. *Syst appl Microbiol* 27:.,pp 380-395.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture et solutions utilisées

Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l

(Vincent., 1970)

Mannitol.....	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
NaCl.....	0.10
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0.20
Extrait de levure	0.5
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 eng/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 Bromothymol5ml

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

CaCl₂ H₂O..... 0,87

pH 6,8

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

Annexe 2

Composition de milieu Défini 8 en g/l (Vincent, 1970)

KH ₂ PO ₄	0.3
Na ₂ HPO ₄	0.3
MgSO ₄	0.21
CaCl ₂	0.21
Glutamate-Na.....	1
Mannitol.....	1
Solution Oligoéléments	1ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Solution oligoéléments (mg/l)

H ₃ BO ₃	50
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	35
CuSO ₄ 5H ₂ O.....	8
MnSO ₄ 4H ₂ O.....	40
ZnSO ₄ 7H ₂ O.....	16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

Annexe 3

Coloration de Gram

Fait à partir des cultures sur YMA on prépare des lame bien étalée en couche mince, séchée et fixée. Puis coloré selon les étapes suivantes :

- Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute.
- Chasser le violet avec du Lugol et ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant 30 secondes.
- Décolorer au mélange alcool-acétone (v/v) jusqu'à la décoloration totale du frottis.
- Laver à l'eau de robinet courante.
- Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1minute.
- Laver à l'eau, séché la lame et observer à immersion.

Année universitaire : 2018/2019

Présenté par : HANNACHI Hafsa Sara
BENTAHAR Maria

**Analyse phénotypique du partenaire symbiotique de la légumineuse
Trigonella foenum-gracum L.**

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

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le but d'analyser phénotypiquement des isolats nodulant *Trigonella foenum-gracum* L. cultivés dans l'est Algérien dans deux Wilaya : Mila et Skikda.

Dans cette étude, un total de 12 isolats ont été obtenus à partir des nodules racinaires, caractérisés par une étude phénotypique (tests biochimiques, tests nutritionnels, et tests physiologiques) qui donne une description comparable à celle des BNL. L'étude montre que tous les isolats ont une croissance rapide. Sont des bâtonnets à Gram-, cellulase+, uréase+, nitrates réductase+, oxydase- et catalase+.

Les isolats sont capables d'utiliser une moyenne gamme de substrats carbonés et azotés. L'étude de la tolérance au différents stress abiotiques a montré que nos isolats peuvent croître à un large intervalle de pH et températures, ainsi qu'une grande tolérance à la salinité allant jusqu'à 10% de NaCl.

Mots clés : *Trigonella foenum-gracum*, BNL, isolats, caractères phénotypiques, nodules racinaires.

Laboratoire de recherche : Biologie moléculaire et cellulaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : *ABDELAZIZ Widad* (Maitre de conférences « B » - UFM Constantine,

Rapporteur : *CHABBI Rabah* (Maitre-assistant « A »- UFM Constantine),

Examineur : *GUERGOURI Ibtissem* (Maitre assistante « A »- UFM Constantine).

Date de soutenance : 14/07/2019

