



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

قسنطينة
كلية الطبيعة الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : .Ecologie Microbienne

Intitulé :

Caractérisation phénotypique des isolats nodulants *Trigonella foenum-graecum* L.

Présenté et soutenu par : *Bousba Wafa et Laib Loubna*

Le : 13/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : *N.Riah* (Maitre de Conférence - UFM Constantine).

Rapporteur : *R.Chabbi* (Maitre-Assistant - UFM Constantine).

Examineurs : *I.Meriane* (Maitre-assistante- UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier notre dieu, qui nous donné la force pour accomplir ce travail.

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

Nous présentons Notre plus grand respect au professeur Mr Benhizia .Y Responsable de laboratoire de recherche de biotechnologie pour l'occasion qu'il nous a donnée afin de réaliser ce travail dans votre laboratoire.

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

Nos remerciements s'adressent les jurys de notre soutenance meriane et Dr. Riahi et Mr.Chabbi.

A toute l'équipe du laboratoire des Biotechnologies du département de Microbiologie de l'université des frères Mentouri de Constantine pour leur soutien matériel et moral

Nous présentons par avance mes excuses aux personnes que j'ai oublié de remercier.

Dédicace

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la force et l'abnégation pour terminer nos études et le présent travail.

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes Chers parents Abdel-el-Aziz et Nadia qui m'ont dirigée et suivie
Durant toutes mes années d'étude, et aussi pour leurs Sacrifices,
Leur patience sans limite et l'éducation
Qu'ils m'ont donnée, je leurs dit merci mille fois.*

Puisse Dieu me les garder.

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:

Mes chères sœurs : Souheïlla

Chahra- zed et son mari Abd-el-Ghani et mes petits beaux neveux :

*Baha-el-dine et Aya qui représente tout le bonheur que j'ai pu
demander au bon Dieu*

Et surtout à mon cher frère : Salah-el-dine

A toute ma belle famille Bousba et Hamdouche

*A mon bras droit, ma moitié et mon binôme Loubna qui m'a apporté :
force, amitié, patience*

Aux mes adorables amis Rihab ,Racha,Lina,yasmine,Meriem,

Nour-el -Hoda et toutes mes amies.

*Enfin je dédie ce travail à tous ceux qui ont contribué un jour à mon
Éducation.*

B. Wafa

DEDICACE

Avant tout je tiens à remercier DIEU, le tout puissant de m'avoir donné suffisamment de courage et surtout de patience pour réaliser ce modeste travail.

*J'ai l'honneur de dédier ce travail à
Ma mère Samia; tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir, tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte*

*Mon grand père Boulaaress et ma grande mère Djamila qui m'ont dirigée et suivie Durant toutes mes années d'étude, et l'éducation, Qu'ils m'ont donnée, je leurs dit merci mille fois.
Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:*

Mon cher frère : Sami

Ma sœur: Dounia

Mes tentes Assia et Souad

Et surtout mon petit gâte Sadjed

Mes cousines Nassrine ,Imen, Lamis

Egalement je dédie ce travail à mes adorables amies:

Dounia, Radia, Safia, Sara , Yamina , Wafa

Finalement je dédie ce travail à ma belle famille.

LOUBNA

Résumé :

Cette étude consiste à mettre en évidence les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Trigonella foenum graecum* L. cultivée dans la région du Bin El Ouidenne commune de Tamalousse wilaya de Skikda, afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique existante entre les 08 isolats en présence de deux souches de référence.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique, suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests, biochimiques et des tests physiologiques.

Sur la base des caractères étudiés, les souches isolées sont très proches au groupe des BNL.

Mots clés : caractérisation, *Trigonella foenum graecum* L., Phénotypique, BNL.

Abstract :

This study is to highlight the bacteria that have been isolated from the root nodules of leguminous *Trigonella foenum graecum* L. growing in the area of Bin El Ouidenne town of Skikda Tamalousse to assess and characterize the diversity phenotypic existing between the 08 isolates with two reference strains.

Strain characterization relates to a morphological study , followed by a phenotypic characterization tests which include , biochemical and physiological tests.

Based on the characters studied , isolates are close to the BNL Group.

Keywords : characterization, *Trigonella foenum graecum* L. Phenotypic , BNL.

:

هذه الدراسة هدفت إلى تشخيص البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للنبات البقولي *Trigonella foenum graecum* المزروعة في منطقة بين الويدان ببلدية تمالوس ولاية سكيكدة بهدف تقييم و دراسة التنوع المظهري المتواجد بين العزلات الثمانية في وجود سلالتين مرجعية.

الدراسة الوصفية للسلاطات قامت على دراسة مورفولوجية متبوعة بدراسة وصفية مظهرية تشمل اختبارات بيوكيميائية و اختبارات فسيولوجية اعتمادا
المعزولة كانت جد قريبة من مجموعة BNL

: دراسة وصفية *Trigonella foenum graecum L.* ، دراسة مظهرية ، BNL

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie de la plante

Tableau 2 : Les derniers remaniements de la classification des rhizobia selon Weir., 2014.

Tableau 3 : souches utilisées dans cette étude

Tableau 4 : Croissance des souches à des différentes températures

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestre	2
Figure 2 : a : pied de <i>Trigonella</i> , b : feuilles, c : gousse d : graines	6
Figure 3 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante	18
Figure 4 : Localisation géographique de la zone de prélèvement	20
Figure 5 : Conservation des nodules sous CaCl ₂	21
Figure 6 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans	22
Figure 7 : Croissance sur YMA+RC	27
Figure 8 : Croissance des bactéries sur milieu GPA+BCP	28
Figure 9 : la croissance sur YMA	29
Figure 10 : croissance sur YMA+BTB	30
Figure 11 : Coloration de Gram [G : × 100]	30
Figure 12 : Test du nitrate réductase	32
Figure 13 : Test d'Uréase positif (+)	33
Figure14 : Test de cellulase positif	34
Figure 15 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches étudiées	36
Figure16 : Effet du pH sur la croissance des isolats T= 24h	38

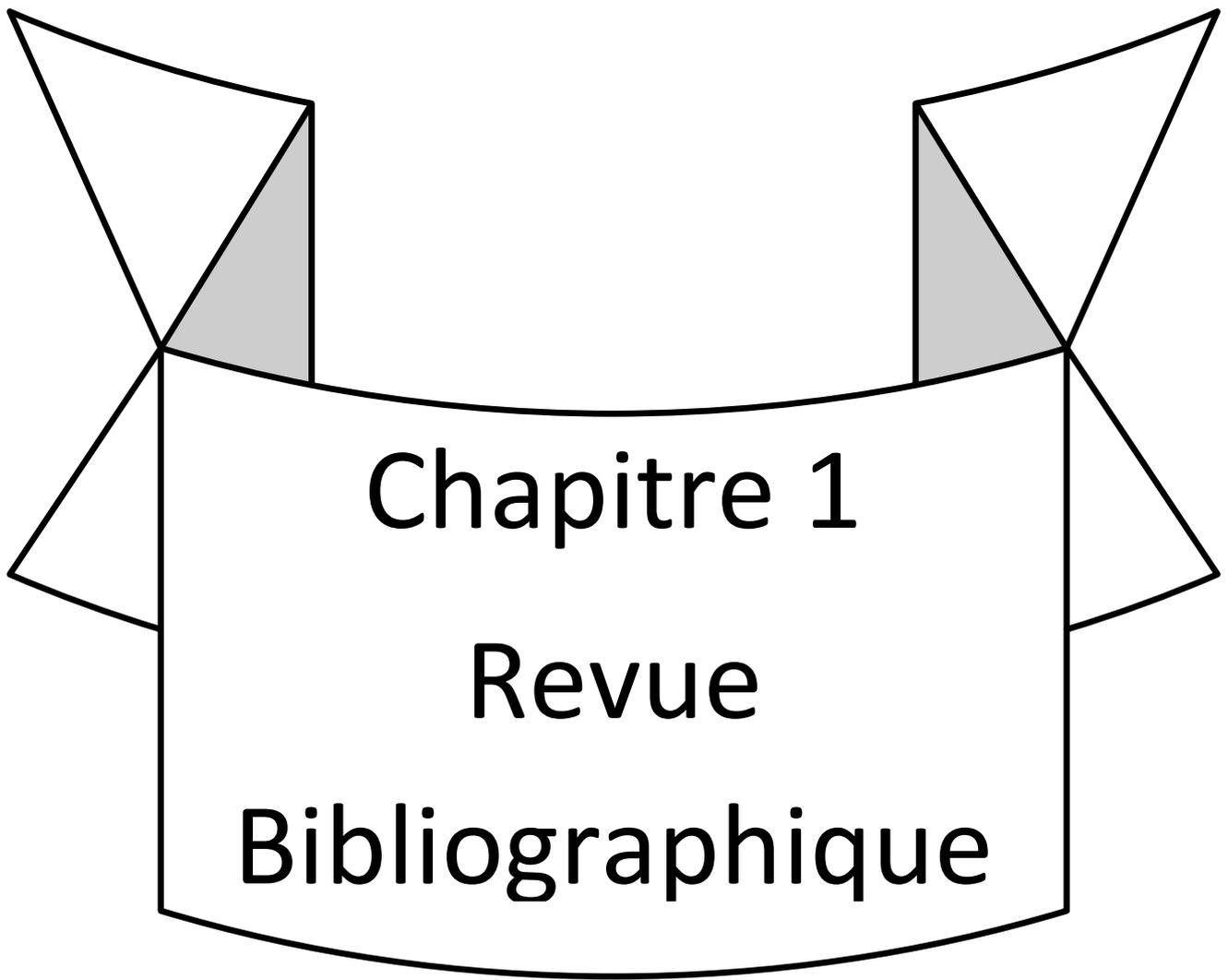
Sommaire

Introduction	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I -L'azote	1
I - 1-Cycle de l'azote	2
I - 2-La fixation d'azote	2
I -3-L'ammonification	3
I -4- la nitrification	3
I -5-La dénitrification	3
II -Symbiose Rhizobium-légumineuse(BNL)	4
II-1-Les légumineuses	4
II-1-1- <i>Trigonella</i>	4
II-1-2-Historique de la plante	4
II-1-3-Taxonomie de la plante	5
II-1-4-Distribution de la plante	5
II-1-5-Morphologie de la plante	5
II-2-Rhizobium	6
II-2-1-Taxonomie des rhizobiums	7
III- La nodulation	16
III-1-Mécanisme de nodulation	16
III -1-1-La pré-infection : reconnaissance des partenaires	16
III 1-2-L'infection	16
III 1-3-Développement de nodule	16

III-2-Généétique de la fixation	17
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	
I -Isolement des bactéries nodulant le fenugrec (<i>Trigonella foenumgraecum L</i>)	19
I-1-Collecte des nodules	19
I -2-Conservation des nodules	20
I-3-Isolement des souches à partir des nodules	20
I -4- Stérilisation des nodules	20
I -5- Isolement des souches	21
II-Caractères cultureux	21
II -1 Principaux milieux de culture utilisés	21
II -2 Purification des isolats	21
II -3- Examen microscopique	22
II -3-1 Coloration de Gram	22
II -4- Conservation des souches	22
III -Caractérisation phénotypiques des isolats	23
III -1-Testes biochimique (recherche de certains enzymes)	23
III -1-1-Réduction des nitrates	23
III-1-2-Hydrolyse de l'urée	23
III-1-3-Activité cellulosique	23
III-2-Testes physiologiques	24
III-2-1-Effet de la température	24
III-2-2-Effet de pH	24
III-2-3-Tolérance au NaCl	24

CHAPITRE 3 : Résultats et discussion

I-Introduction	25
I-Caractères cultureux	25
I-1-Croissance sur YMA+ Rouge Congo	25
I-2-Croissance sur GPA+ +BCP	25
I-3-Croissance sur YMA	26
I-4 Croissance sur YMA+BTB	27
II-Examen microscopique	28
III-Caractérisation phénotypique des bactéries	28
III -1-Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)	28
III-1-1-Réduction de nitrates	28
III -1-2- Hydrolyse de l'urée	29
III -1-3-Activité cellulolytique	31
III -2-Testes physiologiques	32
III -2-1 Tolérance au NaCl	32
III -2-2-Effet du pH	34
III -2-3-Effet de la température	35
Conclusion	38
Référence	40
Annexe	



Chapitre 1

Revue

Bibliographique

Introduction

L'azote est un facteur limitant majeur joue un rôle primordial dans les écosystèmes et dans l'agriculture. Seuls des organismes appartenant au groupe des bactéries sont capable de réduire sous une forme assimilable. La symbiose *Rhizobium*- légumineuses constitue l'un des systèmes fixateurs les plus efficaces qui permettant un couplage entre la fixation d'azote qui demande beaucoup d'énergie et la photosynthèse.

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des *rhizobiums*. Auparavant, le groupe des bactéries qui colonisent les racines des légumineuses n'était composé que d'Alpha-Proteobacteria, mais récemment deux souches de Beta-Proteobacteria ont été décrites comme bactéries capables d'induire une nodulation chez les légumineuses du genre *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) et du genre *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001). Ainsi que des souches de Gamma-Proteobacteria ont été désignées comme des bactéries nodulants les légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004).

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien, mais la diversité des bactéries nodulants les légumineuses reste peu étudiée (Sebbane., 2007).

Ces dans ce contexte que s'intègre notre travail, nous nous sommes intéressées à étudier les bactéries associées aux nodules des racines des espèces des légumineuses du genre *Trigonella* L. Et en particulier l'espèce cultivé *Trigonella foenum-graecum* L.

Dans ce modeste travail nous avons fixé l'objectif suivant : Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugrec)

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- isolement des bactéries à partir des nodules racinaires de fenugrec
- étude morphologique et microscopique des isolats
- une étude comparative entre les isolats des espèces cultivées selon leur écosystème par une caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests :
 - Biochimiques : - recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase)
 - Physiologiques : étude de l'effet des facteurs abiotiques (pH, T°, NaCl).

1 - L'azote

Constituant entre autres des acides amines et nucléiques, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie.

L'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N_2) non assimilable par les plantes alors qu'il constitue, avec le manque d'eau et de phosphate, une des principales limitations à la croissance des plantes (Cleland et Harpole., 2010). Dans le milieu naturel l'azote se trouve sous forme organique et inorganique, l'azote assimilable se manifeste sous forme inorganique ; ammoniac (NH_3), nitrate (NO_3^-), ou N_2 (Madigan et Martinko., 2007)

I-1- Cycle de l'azote

Il existe trois principaux processus de transformation microbienne de l'azote ; la fixation de l'azote diatomique N_2 , la nitrification et la dénitrification. (Madigan et Martinko., 2007)

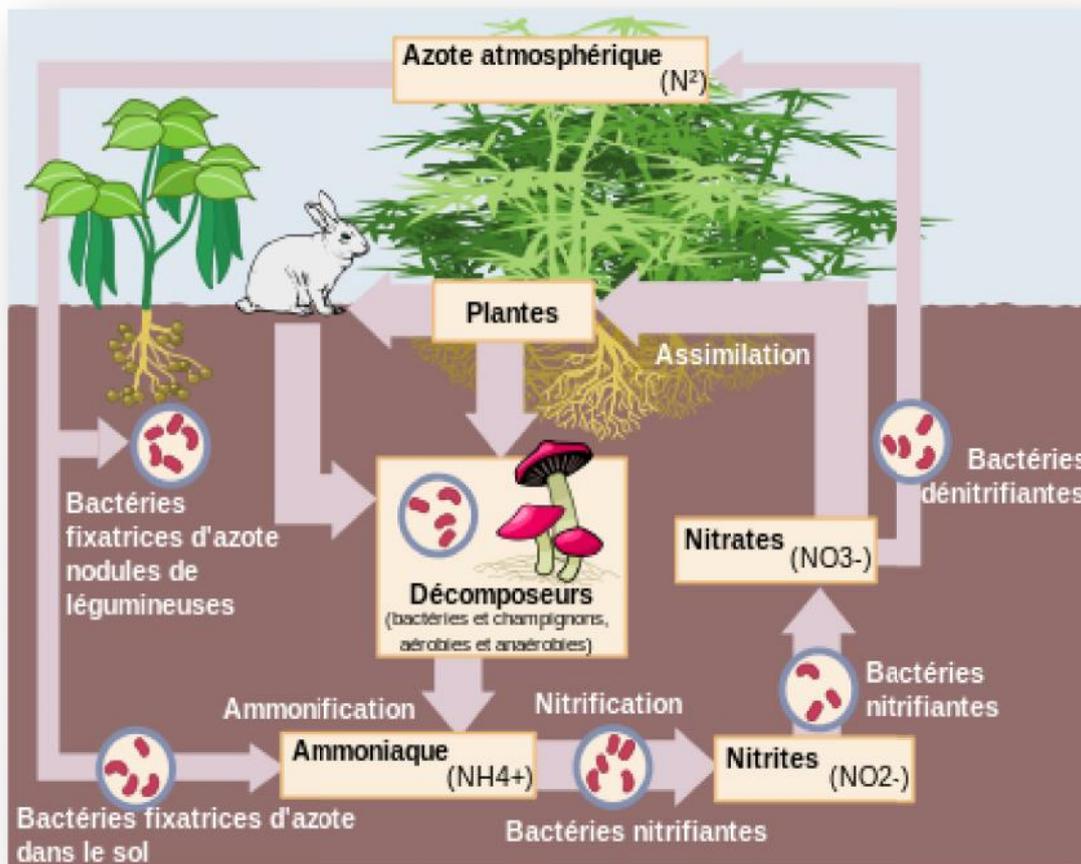
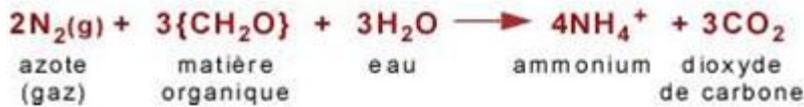


Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic., 2009)

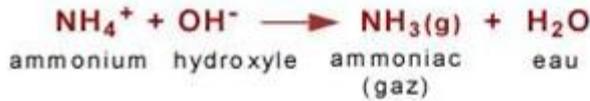
I-2- La fixation de l'azote

La fixation se produit chez des bactéries qui vivent en association symbiotique avec des plantes comme les légumineuses. La réduction de l'azote en ammoniac est catalysée par une enzyme, la nitrogénase. Bien que les intermédiaires liés à l'enzyme dans cette réaction

restent encore inconnus. (Lidmemann., 2003).



Dans les sols où le pH est élevé, l'ammonium se transforme en ammoniac gazeux:



I-3- L'ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH_4^+) sous l'action de micro-organismes hétérotrophes qui utilisent des substrats carbonés comme source d'énergie car, elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO_2^- en NO_3^- ; Cette forme est transitoire et sera transformé ensuite en azote nitrique (Vale., 2006).

Vu la diversité des micro-organismes ammonifiants, l'ammonification est un processus sans exigence écologique particulière, car quelles que soient les conditions de l'environnement, il se trouve toujours dans les sols des espèces microbiennes ammonifiantes adaptées à ces conditions, sauf bien sûr s'il s'agit de conditions incompatibles avec la vie. (Barbbault., 2009)



I-4- la nitrification

La nitrification, soit l'oxydation de NH_3 en NO_3^- , est couramment réalisée dans les sols bien drainés, à pH neutre, suite à l'activité des bactéries nitrifiantes. Alors que la dénitrification consomme du nitrate, la nitrification en produit. Si des matériaux riches en protéines, tels que des engrais naturels ou des rejets, sont ajoutés aux sols, le taux de nitrification augmente. Bien que le nitrate soit facilement assimilé par les plantes, il est très soluble et rapidement lessivé des sols soumis à de fortes pluies. (Madigan et Martinko., 2007)

I-5-La dénitrification

Un processus anaérobie au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux N_2 et l'oxyde d'azote NO_2 , qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.*, 2007). C'est la principale voie de formation biologique de N_2 . De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pracoccus*, *Pseudomonas*. (Madigan *et al.*, 2007).

II- Symbiose *rhizobium*-légumineuse(BNL)

II-1- Les légumineuses

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les Angiospermes, Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae), avec 727 genres et près de 20000 espèces (Cronk *et al.*, 2006). Les espèces vont des herbes naines des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.*, 2001).

Les formes arborescentes sont prédominantes dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont., 2005). Cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (Papilionoideae, Mimosoideae) et la troisième paraphylétique (Caesalpinoideae) (Guignard et Dupont., 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000).

II-1-1- *Trigonella*

Fenugrec (*Trigonella foenum graecum L.*) est une plante aromatique de la famille des légumineuses qui nous vient d'Asie et d'Afrique du nord. Apparenté au trèfle, ce genre réunit environ quatre –vingt espèces d'annuelles. (Geoff *et al.* , 2006).

Le genre *Trigonella L.* est un membre de la famille fabaceae qui a été la deuxième grande famille des plantes fleurissantes (Singh *et al.*, 2008), souvent consommés en graine germées pouvant se cultiver toute l'année , ces plantes sont en plein air , des annuelles à production estivale.(Geoff *et al.* ,2006).

II-1-2- Historique de la plante

Fenugrec est connu sous les noms :

- Arabe:helba
- Espagnole : lasolholvas
- Italien:fienogreco
- Allemand : bockshorn (Gustave , 1861)

Le fenugrec est la plante le plus utilisé dans la thérapeutique de puis les anciens temps. En Egypte antique, il a été employé pour soulager l'accouchement et pour augmenter l'écoulement de lait (Fedelic *et al.* , 2009) ,et pour embaumer les morts et purifier les habitations et des lieux de culte (Journal canadien de microbiologie., 2011).

Dans le présent, il est utilisé par les femmes Egyptiennes pour la douleur menstruelle et comme thé de helba pour soulager les problèmes de l'estomac des touristes (Fedelic *et al.* , 2009) ,et aussi dans la fabrication du pain (Journal canadien de microbiologie 2012).

Depuis l'ancienne temps les Grecs et les romaines sont utilisés le fenugrec dans la médecine et comme fourrage pour les animaux (Singh *et al.*, 2008).

II-1-3-Taxonomie de la plante (Mehani et Segni. ,2012)

Super-Régne	Chlorobiontes
Régne	Plantae
Sous-Régne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnolipsida
Cladus	Fabidees
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Trigonella</i>
Espèce	<i>Trigonella foenum graecum L</i>

II-1-4- Distribution de la plante

Trigonella foenum graecum L. (fenugrec) est une plante originaire à fourrage Europe centrale et méridionale, elle sert d'épice dans de nombreux pays, notamment au Moyen-Orient et en Asie du Proche Orient (Burnie *et al.* , 2006) , aujourd'hui largement cultivée. Dans toute l'Algérie sauf dans la zone côtière. (Quezel et Santa., 1962).

II-1-5- Morphologie de la plante

Le Fenugrec est une plante annuelle de 30 à 60 cm de hauteur. Les feuilles sont composées par trois folioles, dentées, gris-vertes de 20 à 25 mm de longueur. (Moradi Kor *et al.*, 2013) .

Ses petites fleurs blanches de 8 à 10 mm de long de type fleur de pois épanouies, en été, sont suivies de longue gousse étroites (Geoff *et al.* , 2006) de 7 à 10 cm (Quezel et Santa., 1962).

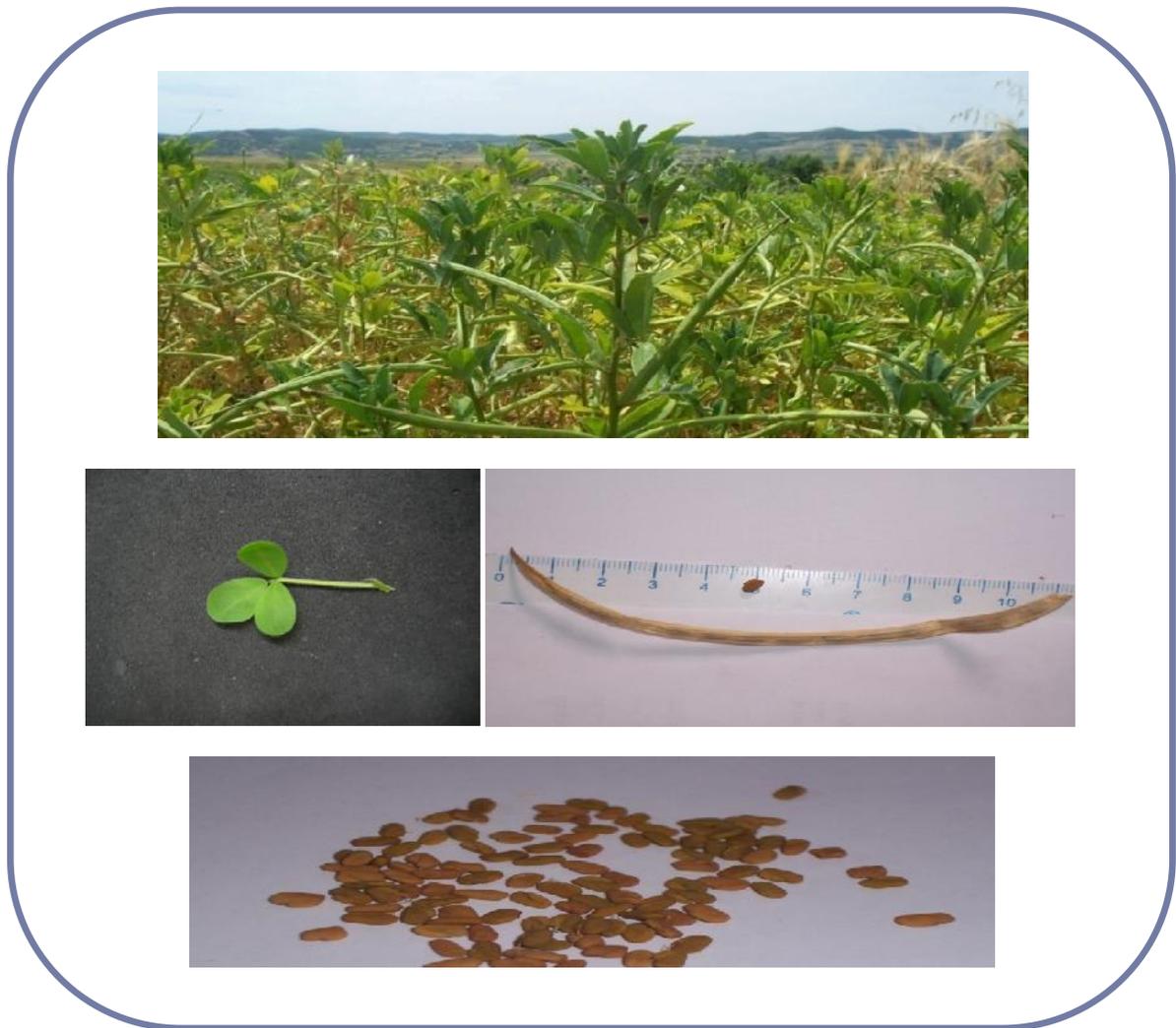


Figure 2: a : tige de *Trigonella*, b : feuilles, c : gousse d : graines

II-2- *Rhizobium*

Les *rhizobium* sont des bactéries qui forment des symbioses fixatrices d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses (Zakhia *et al.*.,2001)

La symbiose *rhizobium*/légumineuse est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobia pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement (Raven *et al.*, 2000). Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. Chez les légumineuses, les rhizobia s'installent dans les racines des plantes. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie et celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Pousset., 2003).

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

II-2-1-Taxonomie des *rhizobiums*

La Taxonomie qui se définit comme l'étude des relations qui existent entre les organismes, englobe la classification, la nomenclature et l'identification. (Vandamme *et al.* , 1996).

Ces trois parties consistent respectivement à classer et à arranger les organismes dans des groupes sur la base de similarités (classification) ,à donner des noms aux groupes trouvés (nomenclature) et enfin à identifier des organismes inconnus pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis (Vandamme *et al.*,1996).

Les rhizobia furent isolés pour la première fois par *Beijerinck* qui nomma la bactérie qu'il isola *Bacillus radicola*.

Ces bactéries furent par la suite renommée *Rhizobium* (Sahgal et Johri ., 2003) la premier classification des rhizobia a été réalisée sur la base des groupes d'inoculation croisée ; elle comportait un seul genre ; le genre *rhizobium* avec six espèces : *R. leguminosarum* ; *R. meliloti* ; *R. trifolii* ; *R. phaseoli* ; *R. lupiniet R. japonicum*. (Zakhia *et al.* , 2001 , Sahgal et johri ., 2003). Sur la base de la vitesse de croissance in vitro ; les *rhizobiums* ont été ensuite reclassés en deux groupes : groupe des bactéries a croissance rapide et celui des bactéries a croissance lente. les deux groupes faisaient toujours partie du genre *Rhizobium* (Sahgal et Johri ., 2003) en 1982 Jordan sépara les deux groupes dans deux genres : le genre *rhizobium* correspondant aux souches a croissance rapide et le nouveau genre ; *Bradyrhizobium* ; pour les souches a croissance lente .Selon la classification actuelle (**tableau 2**).

Les *rhizobia*, ou BNL, forment un groupe de qui sont caractérisées par une diversité génétique et une hétérogénéité physiologique très importantes (Rice *et al.*, 1994 ; Parker., 2002) en effet ; des bactéries appartenant a différents genres et classes taxonomiques sont actuellement connues pour les capacité symbiotique. ainsi les genres *Rhizobium* ; *Sinorhizobium* ; *Mesorhizobium* ; *Ochrobactrum* ; *Allorhizobium* ; *Azorhizobium* ; *Methylobacterium* ; *Bradyrhizobium* ; *Blastobacter* ; *Devosia*(classe des -protéobactéries) ;Burkholderia et Ralstonia (classe des protéobactéries) (Garrity *et al* , 2004) ainsi que certaines protéobactéries (Benhizia *et al.* , 2004) forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuses (Weir , 2006)

Tableau 2 : Les derniers remaniements de la classification des rhizobia selon Weir., 2014.

Classe : <i>Alphaproteobacteria</i> Order: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i> Genre: <i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>		Frank B et al., 1889
	<i>symbiovar viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>	Frank B et al., 1889; Jordan DC et al., 1982
	<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Jordan DC et al., 1982; Renan A et al., 2012
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank B et al., 1889; Jordan DC et al., 1982
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>	Terefework Z et al., 1998; Lindström K et al., 1989
	<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström K et al., 1989
	<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago Macroptilium</i>	Martinez-Romero E et al., 1991
	<i>R. leucaenae</i>		Renan A et al., 2012
	<i>R. tropici</i>		Martinez-Romero E et al., 1991
	<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	López LA et al., 2010
	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
	<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian CF et al., 2008
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>	Segovia L et al., 1993
	<i>symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	Wang LX et al., 1999
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	Souza V et al., 1994
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie P et al., 1998	

<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger N et al., 1997
<i>symbiovar phaseoli</i>		
<i>symbiovar gallicum</i>		
<i>symbiovar giardinii</i>		
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
<i>symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> , <i>Centrosema</i> , etc.	Chen WX et al., 1988
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang ET et al., 1998
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Phaseolus</i>	Van Berkum P et al., 1998
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>	Tan ZY et al., 2001
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Bouzar HD et al., 2001
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp</i>	Wei GH et al., 2002
<i>R. sullae</i>	<i>Indigofera spp</i>	Wei GH et al., 2002
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>	Squartini A et al., 2002
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i>	Wei GH et al., 2003
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>	Garcia-Fraile P et al., 2007
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	Gu CT et al., 2008
<i>R. multihospitium</i>	Multiple legume species	Han TX et al., 2008
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	Peng G et al., 2008
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Ramirez-Bahena MH et al., 2008
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia</i> , <i>Kummerowia</i> <i>Dalbergia</i>	Lin DX et al., 2008
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berge O et al., 2009
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu YL et al., 2009

	<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	Hou BC et al., 2009
	<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	El Akhal MR et al., 2008.
	<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>	Hou BC et al., 2009
	<i>R. radiobacter</i>	*	Young JM et al., 20011
	<i>R. rhizogenes</i>	*	
	<i>R. rubi</i>	*	
	<i>R. vitis</i>	*	
	<i>R. nepotum</i>	*	Pulawska J et al., 2012
	<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Dangeard PA 1926.
	<i>E. fredii</i>		
	<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanu</i>	Scholla MH and Elkan GH 1984
	<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>	Chen WX et al., 1988
	<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>	de Lajudie P et al., 1994
	<i>E. terangae</i>	<i>Different host plants</i>	
	<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>	Young JM et al., 2001
	<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>	Lorquin J et al., 1997
	<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>	Rome S et al., 1996
	<i>E. arboris</i>		
	<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick G et al., 1999
	<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>)	<i>Glycine max</i>	Chen WX, Yan GH, Li J 1988
	<i>E. adhaerens</i>	*	Casida LEJ 1982
	<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>	Wei GH et al., 2002

	<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Toledo I et al., 2003
	<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret L et al., 2007
	<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>	Merabet C et al., 2010
Genus: Shinella	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Lin DX et al., 2008
Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i> Genus: <i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>	Jarvis BDW et al., 1982
	<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen H et al., 1991
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour SM et al., 1994
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	arvis BDW et al., 1997
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour SM et al., 1995
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>	de Lajudie P et al., 1998
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang ET et al., 1999
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velásquez, E et al., 2001
	<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao JL et al., 2004
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	
	<i>M. thioangeticum</i>	*	
	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang FQ et al., 2007
	<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	Guan SH et al., 2008
	<i>M. gobiense</i>	<i>Wild legumes</i>	Han TX et al., 2008
<i>M. tarimense</i>			

	<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	
	<i>M. opportunistum</i>		Nandasena et al., 2009
	<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal C et al., 2009
	<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>	Chen WM et al., 2011
	<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>	
	<i>M. abyssinicae</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Degefu T et al., 2013
	<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang JJ et al., 2012
	<i>M. hawassense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Degefu T et al., 2013
	<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng WT et al., 2013
	<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou PF et al., 2010
	<i>M. shonense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Chen H et al., 1991
	<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana species</i>	Lu YL et al., 2009
	<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus species</i>	Zhao CT et al., 2012
	<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>	Ramirez-Bahena MH et al., 2012
Genus: <i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde A et al., 2005

	<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Islam MS et al., 2008
	<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>	Zhang YM et al., 2012
	<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahbourne R et al., 2011
	<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	Wang JY et al., 2013
	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	Van Berkum P et al., 2006
	<i>B. oligotrophicum</i>		Ramirez-Bahana MH et al., 2013
	<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	
Class: Beta Proteobacteria Order: Burkholderiales Famille: Burkholderiaceae Genus: Burkholderia			Van Berkum P, Eardly BD 2002
	<i>B. caribensis</i>	<i>Vertisol microaggregates</i>	Achouak W et al., 1999
	<i>C. taiwanensis</i> B. <i>Cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	Moulin L et al., 2001
	<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</i>	Vandamme P et al., 2003
	<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	
	<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata,</i> <i>Mimosa scabrella</i>	Chen WM et al., 2007
	<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Chen WM et al., 2008
	<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Chen WM et al., 2003
	<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Partida-Martinez LP et al., 2007
	<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Sheu SY et al., 2013

Famille: <i>Methylobacteriaceae</i> Genus: <i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>	Jourand P et al., 2004
Genus: <i>Microvirga</i>	<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus sp.</i>	Ardley JK et al., 2012
	<i>M. lotononidis</i>	<i>Different legume</i>	
	<i>M. zambiensis</i>	<i>host</i>	
Famille: <i>Brucellaceae</i> Genus: <i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum</i> <i>cytisi</i>	<i>Cytisus</i>	Zurdo-Piñeiro JL et al., 2007
	<i>Ochrobactrum</i> <i>lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trujillo ME et al., 2005
Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i> Genus: <i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus B et al., 1988
	<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira FMS et al., 2006
	<i>A. oxalatiphilum</i>		Lang E et al., 2013
Genus: <i>Devosia</i>	<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas R et al., 2003
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i> Genus: <i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max,</i> <i>Glycine soja</i>	Jordan DC 1984 ; Jordan DC et al., 1982
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	KuyKendall LD et al., 1992
	<i>B. liaoningensese</i>		Xu LM et al 1995
	<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	Yao ZY et al., 2002
	<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>	Rivas R et al., 2004
	<i>B. canariense</i>	<i>Genisteeae et</i> <i>Loteae</i>	Vinuesa P et al., 2005
	<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada</i> <i>koshunensis</i>	Islam MS et al., 2008
	<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus</i> <i>erosus</i>	Ramirez-Bahana MH et al., 2009

	<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Partida-Martinez LP et al., 2007
	<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>	Aizawa T et al., 2010
	<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp.</i>	SHEU(S.Y.) et al., 2012
Genus: <i>Cupriavidus</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>		
	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa sp.</i>	VandammeP, Coeyene T 2004
Class: <i>Gamma-Proteobacteria</i> Order: <i>Pseudomonadales</i> Famille: <i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Shiraishi A et al,2010

III- La nodulation

III-1- Mécanisme de nodulation

La symbiose légumineuse-rhizobia se traduit par la formation d'un nouvel organe, le nodule racinaire, au sein duquel les rhizobia fixent l'azote atmosphérique. Le processus de nodulation commence lors de la pré-infection, par une phase de reconnaissance entre les deux partenaires, et qui est suivie de deux étapes quasiment simultanées, l'infection de la racine par les bactéries et l'organogenèse du nodule (Patriarca *et al.* , 2004).

III-1-1-La pré-infection : reconnaissance des partenaires

La plante sécrète au niveau de ses racines des flavonoïdes qui induisent les gènes *nod* de la bactérie. Les gènes *nod* codent pour des protéines Nod qui participent à la synthèse et à la sécrétion des facteurs « Nod » ou FNods. Les FNods induisent chez la plante des réponses essentielles au processus symbiotique (Cooper., 2007).

III-1-2- L'infection

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen ., 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité (Rasanen., 2002).

III-1-3- Développement de nodule

La formation de nodule consiste en un relâchement des *rhizobiums* à partir des cordant d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des *rhizobiums* en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de Bactéroïdes (Machrafi.,2001). **(Figure 3).**

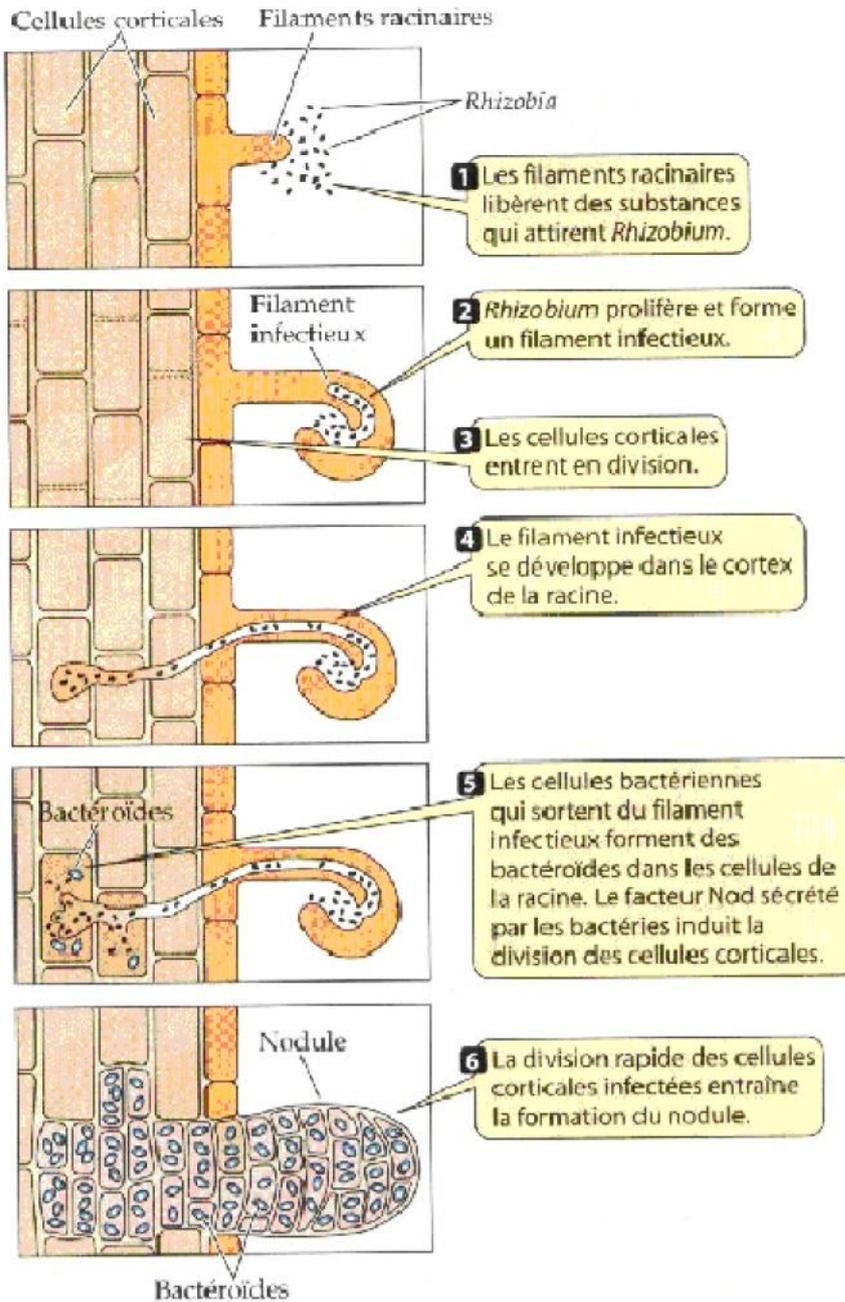


Figure 3 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004).

III-2- Génétique de la nodulation

Certaines bactéries fixant l'azote vivent en liberté, mais la plupart des espèces symbiotiques comme le genre *Rhizobium* vivent au sein de nodosités sur les racines de légumineuses. (Michelle., 2006).

La formation de ces nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante. (Michelle., 2006).

- Gène *sym*

Gènes nécessaires à la formation de nodosités symbiotique fonctionnelles fixant l'azote.

- Gène *nod*

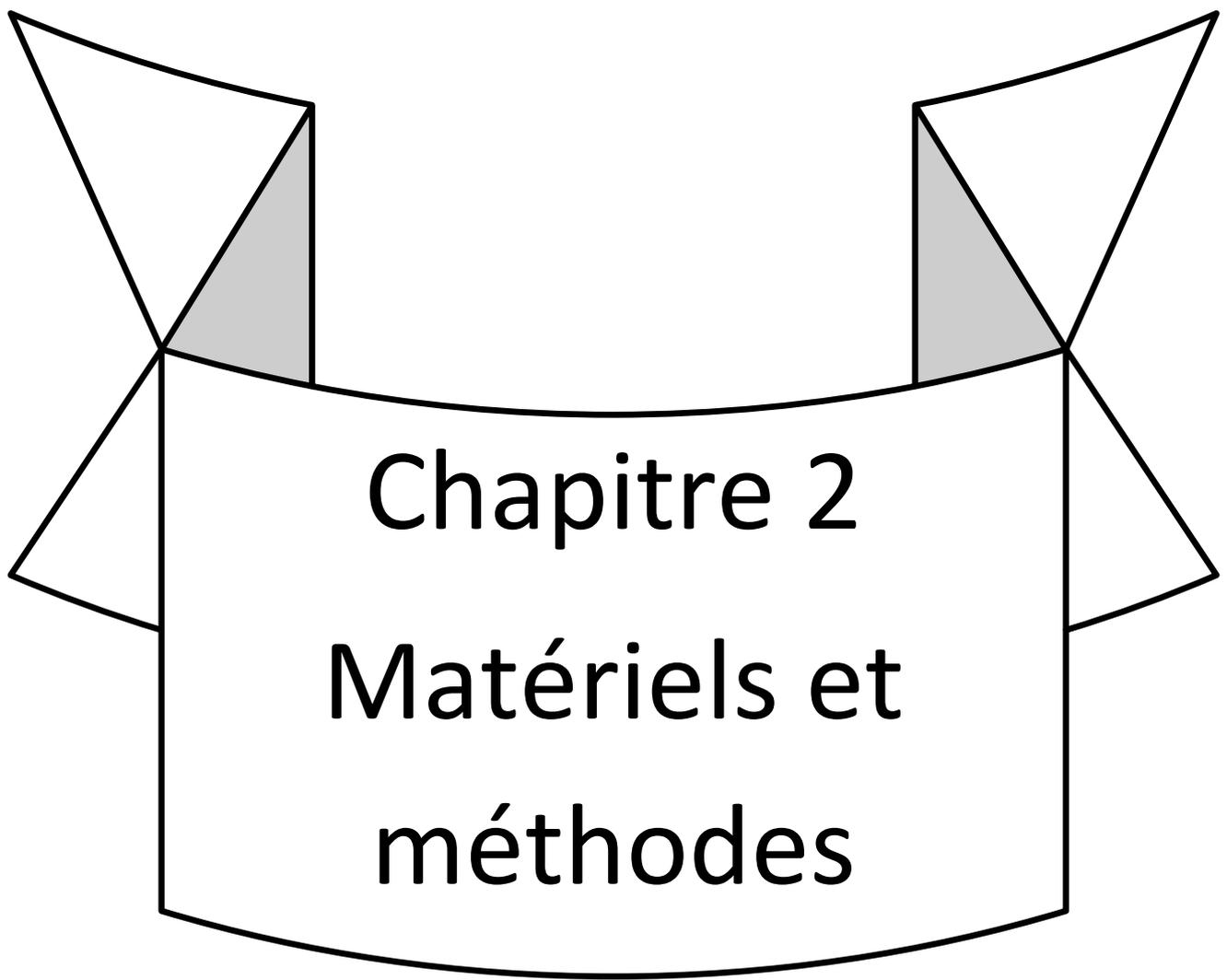
Gènes nécessaire à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités, autre gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités : les génies *nol* et *noe*.

- Gène *fix*

Gènes nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote.

- Gène *nif*

Gènes codant pour les trois sous unités hautement conservées de la nitrogénase (réduisant l'azote moléculaire en ammoniac), ainsi que pour des protéines auxiliaires nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Ces gènes symbiotiques sont induit seulement lorsque les bactérioses peuvent fixer l'azote, c'est-à-dire quand la bactérie peut noduler la plante (Dénaire *et al.*, 1996).



Chapitre 2

Matériels et
méthodes

I- Isolement des bactéries nodulant le fenugrec (*Trigonella foenumgraecum L.*)

Les nodules ont été obtenus à partir du genre végétal *Trigonella L* qui été cultivé dans la région de Bin El Ouidenne (latitude 36°48' 15''N et longitude 6°34' 2E) commune de Tamalousse wilaya de Skikda (21). (Figure 4)

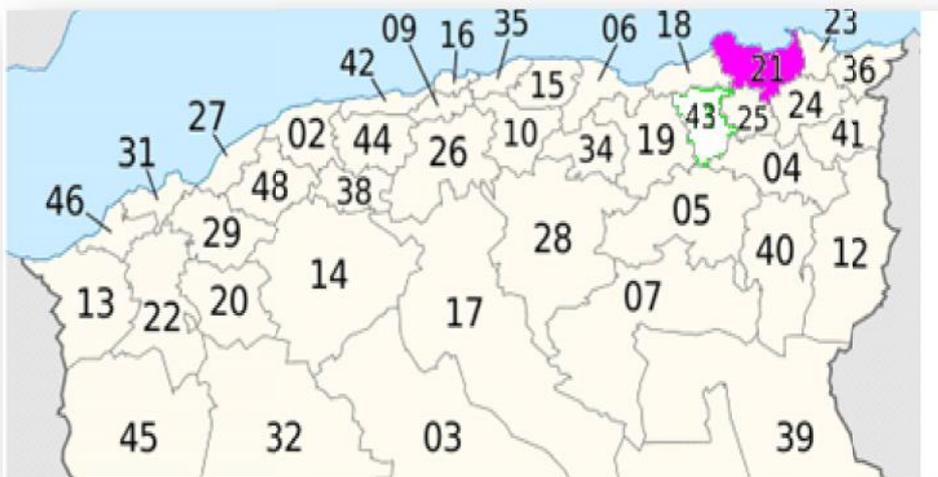


Figure 4: Localisation géographique de la zone de prélèvement

I-1- Collecte des nodules

Les nodules ont été collectés à partir des plantes durant la saison de croissance végétative lorsque les nodules sont de couleur rouge brun, bien développés et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peut indiquer la présence de la leghémoglobine.

L'opération effectuée selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran Hoben (1994) :

- On creuse environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur pour extraire la plante et son appareil racinaire .On débarrasse soigneusement le sol lié au niveau des racines pour ne pas endommager les nodules, enfin on place le tout dans un sac en plastique.
- Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau courante pour éliminer toute trace de terre .Les nodules sont détachés à 1-2mm du site d'attache, puis rincées et séchées par du papier filtre.

I-2-Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 h pour un usage immédiat. Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de calcium (CaCl_2) (Vincent., 1970) .qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du CaCl_2 (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules. (Figure 5).

Sur chaque flacon sont mentionnées le nom de la plante, date et lieu de collecte, et la date de la conservation.

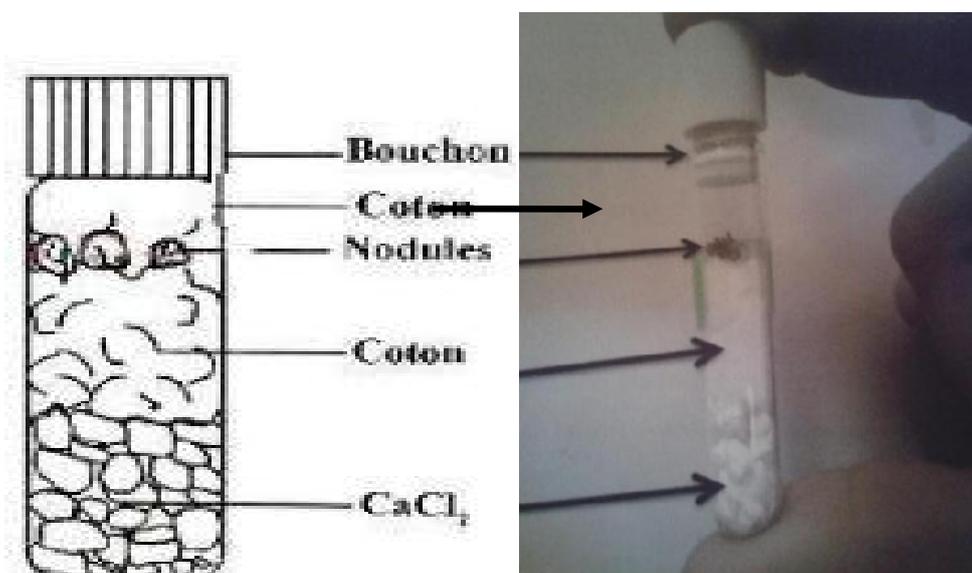


Figure 5 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent., 1970)

I-3- Isolement des souches à partir des nodules

Les nodules fraîchement lavés sont détachés de la racine à l'aide d'une pince et utilisés directement alors que ceux qui seront conservés par dessiccation sont réhydratés durant une nuit au réfrigérateur dans de l'eau distillée, puis laissés pendant une heure à température ambiante (Vincent., 1970 et Somasegaran Hoben., 1994).

I-4- Stérilisation des nodules

Les nodules intacts sont immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis avec l'hypochlorite de sodium 3% pendant 3 minutes. Et en suite les nodules sont rincés 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laissés gonfler après le 10^{ème} rinçage.

I -5- Isolement des souches

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. À l'aide d'une anse de platine, le jus de nodule est étalé sur boîte de pétri contenant le milieu YMA (Vincent 1970) additionné de rouge Congo (**Annex1**). L'ensemencement est réalisé selon la méthode des quatre cadrans (**Figure 6**) de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les mêmes nodules sont ensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar (GPA) additionné de pourpre de bromocrésol (**Annex1**).

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

Les boîtes sont incubés trois jours à 28°C .pendant 48à 72h. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée...).

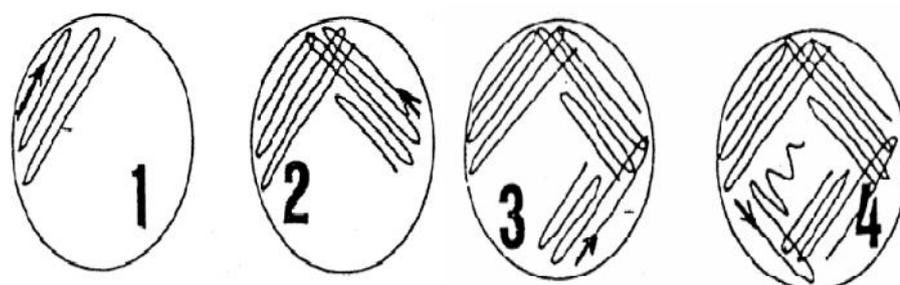


Figure 6: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent., 1970)

II-Caractères cultureux

II -1 Principaux milieux de culture utilisés

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

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

- Milieu liquide: YMB (Yeast Manitol Broth)
- Milieux solides: YMA (Yeast Manitol Agar)
 - YMA + RC (Yeast Manitol Agar+ *Rouge de Congo*)
 - YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Blue)
 - GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

II -2 Purification des isolats

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

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis incubées à 28°C pendant 24h à 48h. Quand le bouillant est troublé, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique sont enfin réalisés.

II -3- Examen microscopique

II -3-1 Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram - (Annexe 2).

II -4- Conservation des souches

Avant de conserver les souches, elles sont ensemencées dans des tubes contenant 9ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h avec agitation à 30°C.

La technique de conservation utilisée est celle décrite par (Vincent., 1970). Le milieu YMA(Annex1) additionné de 1 à 3g/L de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité, des stries de la souche à conserver sont effectuées sur la surface de la gélose et les souches sont incubées à 30°C pendant 3 jours. Cette technique permet une conservation de 6 à 12 mois à 4°C (Vincent., 1970).

Tableau 3 : Souches utilisées dans cette étude

Code de l'isolat	Nom de la souche	Plante hôte	Origine géographique	Source
TC1X	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda	Notre étude
TC1Y	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
TC2	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
TC3	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
TC4	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude

TC1'	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda	Notre étude
TC2'	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda	Notre étude
TC3'	Non déterminé	<i>Trigonella</i>	Skikda	Notre étude
F	<i>Rhizobium sullae</i> <i>RHF</i>	<i>Hydesarum</i> <i>coronarium</i>	Constantine	A. Benguedouar
SAM12	<i>Rhizobium</i> <i>leguminosrum</i>	Pois chiche Cicer arietinum.L .	Jijel	S. Dekkich

III- Caractérisation phénotypiques des isolats

III-1-Tests biochimique (recherche de certains enzymes)

III-1-1- Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur bouillon Tryptone-Yeast (TY) (Annexe1) contenant 0,1% de KNO_3 (p/v) à 28°C pendant 4 jours ; après incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate 1 (Acide sulfanilique (3) dans l'acide acétique (5M) et nitrate 2 (naphtylamine dans l'acide acétique). L'apparition d'une coloration rouge ou rose indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de poudre de zinc et observer après quelques minutes la teinte obtenue. (La couleur rouge signifie la non réduction des nitrates, alors que un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche a le nitrate réductase).

III-1-2-Hydrolyse de l'urée

Les souches sont cultivées sur milieu YMA (**annexe 1**), contenant 2% d'urée (p/v) et 0.012 g/l de rouge de phénol (indicateur de pH).

La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0.2 μm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C sous la hotte à flux laminaire puis incubé à 28°C pendant 48h.

III-1-3-Activité cellulosique

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode du rouge Congo de Teather et Wood (1982), composé capable de se lier de manière stable à une molécule non dégradable de Carboxyle Méthyle Cellulose (CMC). Les souches

sont mises en culture pendant 5 jours sur le milieu YMA contenant 0,25% de CMC. Après incubation à 28°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 min à 28°C. La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1M ; les boîtes sont ensuite laissées à une température ambiante puis vidées.

Si le fond de la boîte présente un halo jaune-orangé autour des colonies, on note la présence de l'enzyme endoglucanase chez les souches.

III-2-Tests physiologiques

III-2-1-Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mis en culture sur le milieu TYA et incubées à différentes températures : 4°C, 28°C, 37°C et 44°C.

III-2-2-Effet du pH

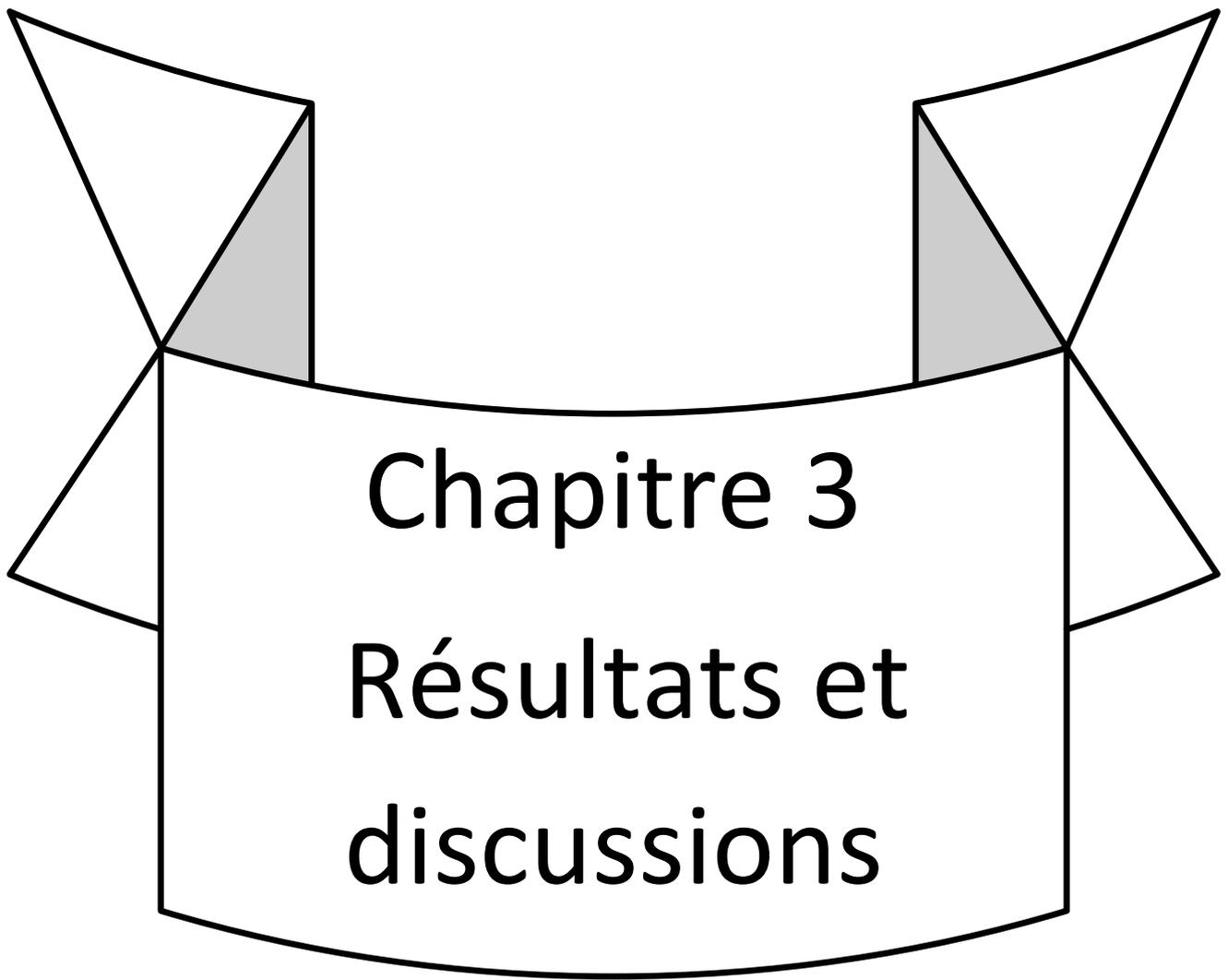
On ensemence sur des bouillons TYB ajustés à des différents pH : (3, 4, 5.5, 6.8, 8 et 10).

La DO est mesuré après 24h d'incubation à 600 nm.

III-2-3-Tolérance au NaCl

Les isolats et les souches témoins sont ensemencés dans des tubes de 5ml du milieu TYB avec différentes concentration de chlorure de sodium NaCl : (1%, 2%, 3%, 5% et 10%). Incubation à 28°C avec agitation pendant 24h.

Mesurer la DO à 600 nm.



Chapitre 3
Résultats et
discussions

Introduction

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les BNL les mieux étudiées, la base de description formelle de taxon. Depuis les espèces et les sous espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme *et al.* , 1996).

I- Caractères cultureux

I-1- Croissance sur YMA+ Rouge Congo

Après 48h d'incubation de YMA+ Rouge Congo on observe des colonies lisses, visqueuses, avec une couleur translucide généralement elles n'absorbent pas le Rouge de Congo et restent blanches rarement rose. (**Figure 7**).

Kneen et La Rue (1983), ont déclarés que les souches de *R.meliloti* et *R.trifoli* sur YMA- rouge Congo apparaissent blanches, roses, oranges ou rouges. Ceci est valable pour les souches Gammaproteobacteria (Benhizia., 2006) qui présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo.



Figure7:Croissance sur YMA+RC

I-2- Croissance sur GPA+ +BCP

Sur le milieu GPA ; on note le développement des colonies de couleurs blanchâtres n'ayant pas acidifié le milieu de forme ronde d'aspect visqueux après 48 heures d'incubation chez toutes les souches. (**Figure 8**).

Le virage de couleur de l'indicateur de pH vers le pourpre indique une alcalinisation du milieu lorsque le $\text{pH} > 6,8$.



Figure 8 : Croissance des bactéries sur milieu GPA+BCP

I-3-Croissance sur YMA

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur le milieu YMA. Les colonies des isolats TC1x, TC1y, TC2, TC3, TC4, TC1', TC2', TC3' ont des formes circulaires, un contour régulier, une surface bombée et une consistance visqueuse, texture homogène et brillant. (**Figure 9**).

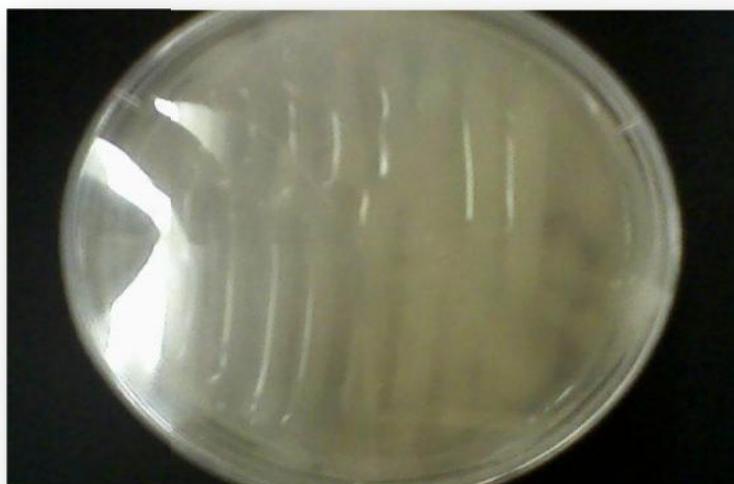


Figure 9 : la croissance sur YMA

I-4-Croissance sur YMA+BTB

Sur le milieu YMA+bleu de Bromothymol on observe un virage de couleur du vert vers le jaune pour les isolats Tc1x, Tc1', Tc3' (**Figure 10**). Ce virage de couleur après 3 jours d'incubation signifie une acidification du milieu ce qui prouve que ces isolats ont une croissance rapide (Beck *et al.*, 1993), contrairement aux souches Tc1y, Tc2, Tc3, Tc4, Tc2' à croissance lente (croissance après 5 jours) qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan., 1984 ; Beck *et al.*, 1993 ;Pagano., 2008).

Le bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique.

Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du BTB vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali., 2006).

Xue *et al* (1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YMA+ BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.

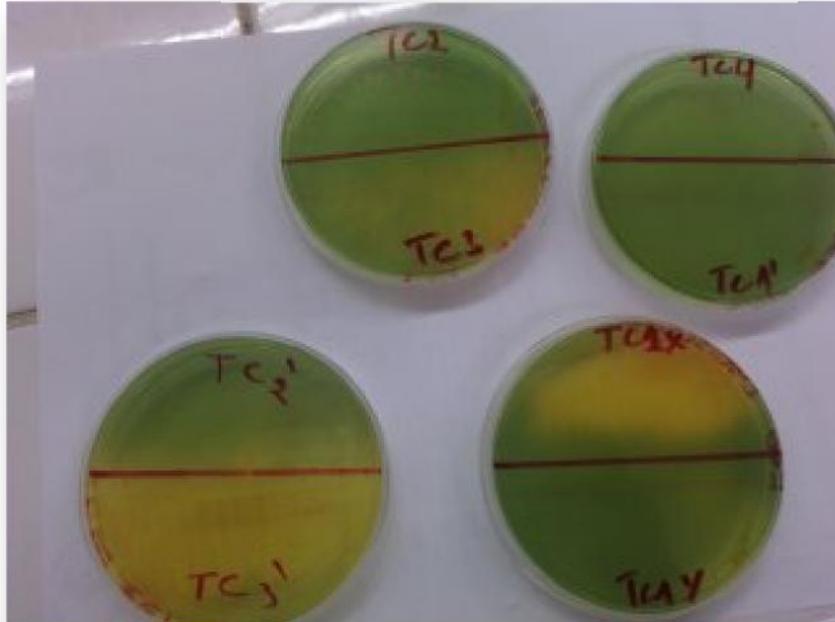


Figure 10: croissance sur YMA+BTB

II-Examen microscopique

L'examen microscopique des cellules bactériennes va permettre de visualiser des bactéries de formes bâtonnets de taille différente roses, Gram négatif.

(Figure 11).



Figure11 : Coloration de Gram [G : × 100]

III-Caractérisation phénotypique des bactéries

III-1-Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)

Le but consiste à rechercher certaines enzymes qui jouent un rôle lors de l'infection (nodulation) des racines par les bactéries, particulièrement, la cellulase, la nitrate- réductase et l'uréase.

III-1-1-Réduction de nitrates

Après 4 jours d'incubation, l'apparition de la couleur rouge ou rose après addition de 2 à 3 gouttes des réactifs I et II de la nitrate réductase indique la réduction des nitrate en nitrite par les isolats Tc1x, Tc1y, Tc2, Tc3, Tc4, Tc2' se que signifie qu'elles possèdent l'enzyme nitrate réductase. (Figure12).

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue des caractères taxonomiques important (Joffin et al., 2006). Et se fait selon la réaction suivante :



Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification, dans ce cas on recherche la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites. Deux cas sont possibles :

Une apparition d'une teinte rouge signifie que les ions nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrites par le zinc et ont réagi avec les réactifs, la nitrate réductase est donc négative.

Absence de coloration rouge signifiant au contraire les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries et l'addition de zinc ne peut produire de nitrites. La nitrate réductase est donc positive jusqu'au stade azote.

Les souches Tc1', Tc3' donnent un résultat négative.

Le nitrate, produit de nitrate réductase, inhibe fortement l'activité de la nitrogénase dans les Bactéroïdes à des concentrations inférieures à 100 μ M. Une étude sur la distribution de la nitrate-réductase indique qu'elle est constitutive dans le cytosol des cellules hôtes et une proportion est liée à la membrane des Bactéroïdes

(quoique pas dans tous les rhizobia) qui est induite par les nitrates (Kennedy *et al.*, 1975).

En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines (Sherwood *et al.*, 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986 ; Arreseigor *et al.*, 1997).



Figure 12 : Test du nitrate réductase

III-1-2- Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis *et al* (1977), en utilisant le Rouge de Phénol comme indicateur de pH.

Lorsque les souches augmentent le pH suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par changement de la couleur du milieu vers Le rose.

Après l'incubation des boîtes pendant 48 heures nous avons observé que toutes les souches Tc1x, Tc1y, Tc2, Tc3, Tc4, Tc1', Tc2', Tc3' donnent une couleur rose violet du milieu c'est-à-dire alcalinises le milieu (Uréase +). Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium. **(Figure 13)**.

Par contre les souches qui sont acidifier le milieu donnant des colonies roses sur un milieu vire le rouge (rouge de Phénol) ver le jaune (Uréase -).

L'enzyme peut être « constitutive », c'est-à-dire présente dans la bactérie indépendamment de celle de l'urée : l'enzyme sera révélée rapidement (quelque minute à deux heures). Pour d'autres bactéries, la synthèse est induite par l'urée et la révélation peut donc demander plus de temps (Joffin *et al.*, 2006).

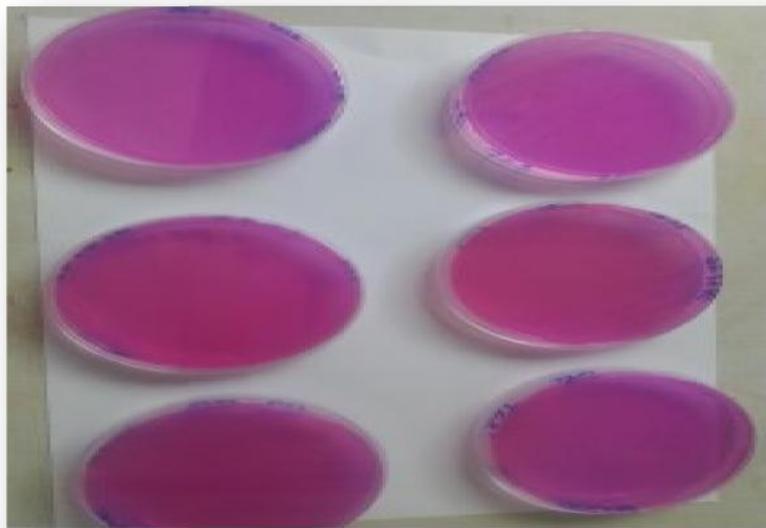


Figure 13 : Test d'Uréase positif (+)

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière.

III-1-3-Activité cellulosytique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose. Nous avons observé un halo jaune orange autour des colonies des isolats Tc1x, Tc1y, Tc2, Tc3, Tc4, Tc1', Tc2 ' donc mettant en évidence l'activité d'un endoglucanase (cellulase) (**Figure 14**). Seulement la souche Tc3' ne possède pas une enzyme de cellulase.

Les hémicelluloses et surtout la cellulose sont des constituants majeurs des cellules végétales (Davet ., 1996), la démonstration de la présence de la cellulase et de l'hémicellulase en plus de la pectinase chez les rhizobia suppose que ces dernières infectent la plante légumineuse en hydrolysant la paroi des cellules racinaires dans le site d'infection (Martinez-Molina., 1979).

Baumberger *et al.* (2002) ont confirmé que l'activité de la cellulase est trouvées chez plusieurs espèces rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *B.japonicum* , et les différentes souches du *R. leguminosarum*.

Deux iso-enzymes CMCase de structure et de poids moléculaire différents sont déterminés par Hu et Lin (2003) produits par la souche *Sinorhizobium fredii* CCRC15769.

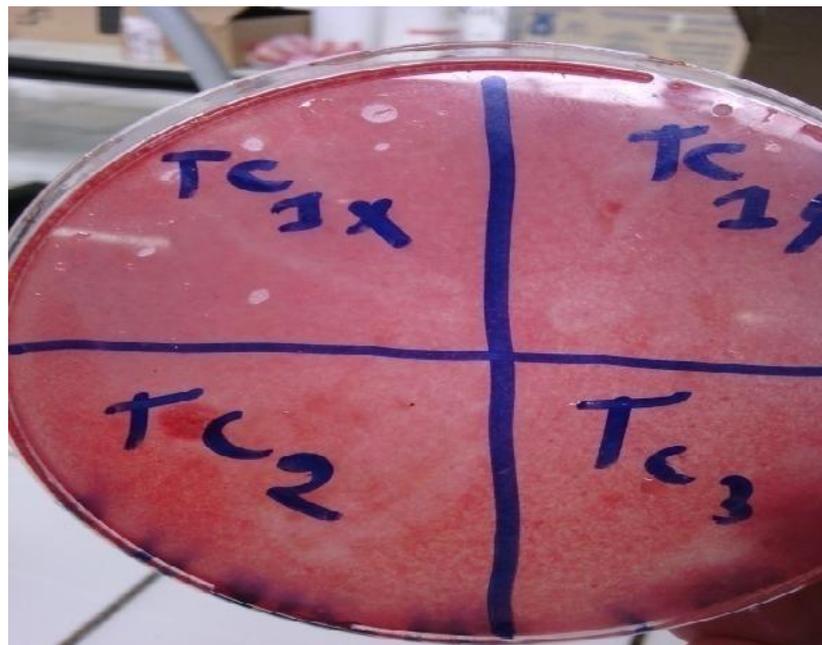


Figure14 : Test de cellulase positif

III-2-Tests physiologiques

III-2-1 Tolérance au NaCl

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

Nous avons observées une bonne croissance à des concentrations de NaCl variant de 1% à 3% après 24h d'incubation et une faible croissance à la concentration 10% de NaCl pour tous les isolats et souches de référence SAM 12 et F. (**figure15**).

La salinité diminue la survie des rhizobia et inhibe l'expansion et la courbure des poils absorbants ainsi que la fixation des rhizobia sur les poils semble être sensible au stress salin, ce qui entraîne une réduction du nombre de ces organes symbiotiques. (Saadallah *et al.*, 2001 ;Benkhaled ., 2003) et également affecte le processus de nodulation en retardant l'initiation ou la croissance de nouveau nodules ainsi que la fixation symbiotique de l'azote (Roe *et al.*, 2002) .

Moshetti *et al.*, (2005) ont trouvé que la majorité des souches de *R. leguminosarum* bv *viciae* ne sont capables de croître qu'à 0.1% mais qu'il existe quelques unes avec une bonne croissance à des concentrations entre 1% et 2% et une souche résiste même à une croissance de 5% de NaCl.

Chabbi (2010) trouvé que la majorité des souches isolées à partir de la plante *Trigonella foenum-gracum* L. (fenugrec) montre une variabilité relative de tolérance vis-à-vis de la salinité et quelques une sont capables de croître jusqu'à 5% de NaCl.

La sélection de *rhizobium* pour une symbiose effective en milieu salin nécessite donc deux critères : tolérance du *rhizobium* au sel et effectivité du *rhizobium* en présence de la plante hôte (Chabbi., 2010).

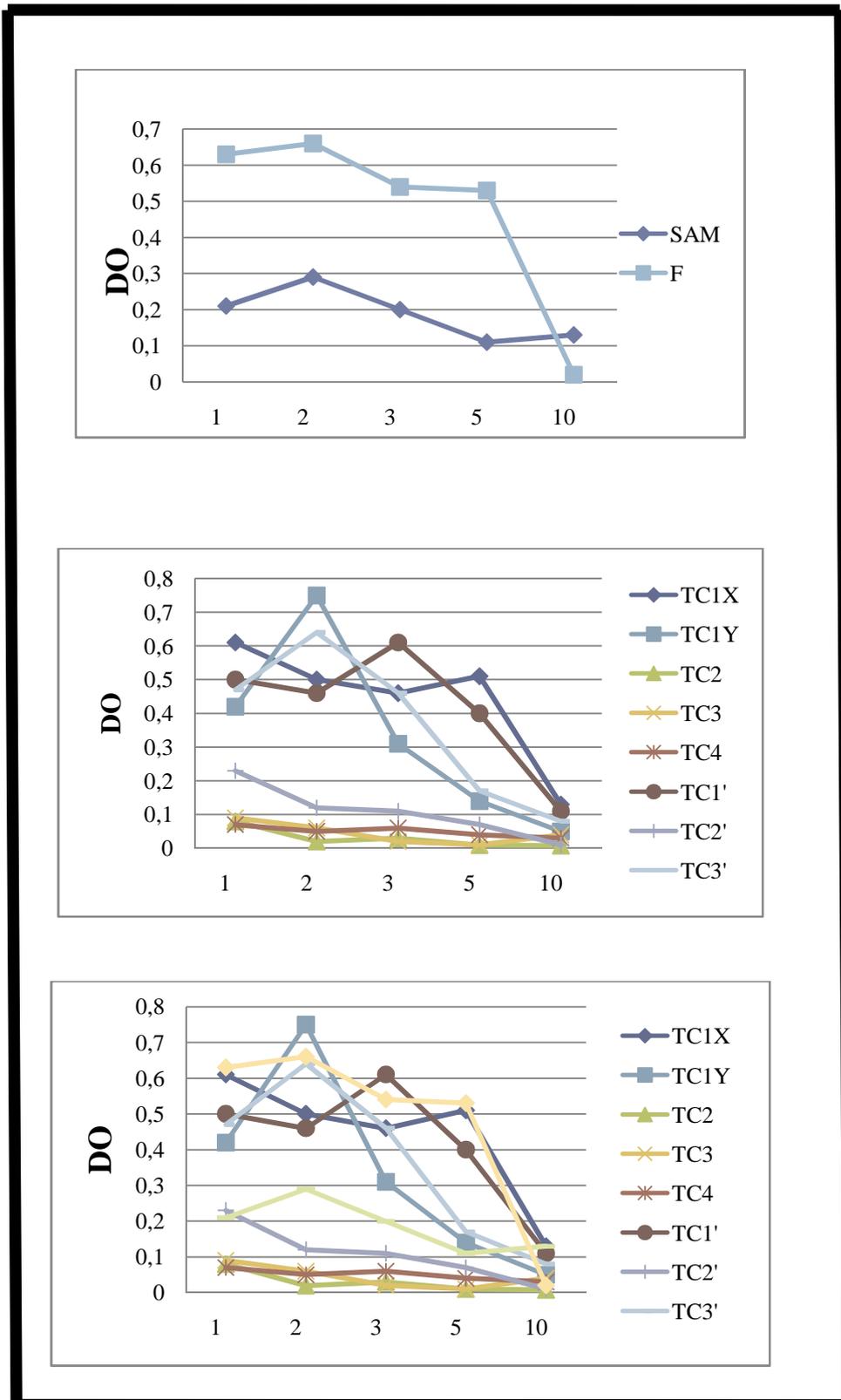


Figure 15 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches étudiées

III-2-2-Effet du pH

Une croissance optimale de la majorité des isolats est observée entre 6.8 et 8 (pH neutre) ainsi qu'au pH alcalin, au pH acide, on observe une croissance moindre. Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de la croissance des *rhizobiums* est entre 6 et 7. **(Figure 16)**

Les rhizobiums adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acide du sol (Zahran., 1999). Dans plusieurs bactéries, comme *R. léguminosarum* *bv* *Trifolii* ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu (Correa et Barneix., 1997). L'alcalinité est moins néfaste pour la survie des *rhizobiums*. Jordan (1984) a montré que la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9, ce qui est le cas de tous nos isolats. L'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du *rhizobium* et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (Appunu et Dhar., 2006).

D'après El-Hilali (2006) la tolérance des souches à l'acidité est peut être due au pH acide du milieu d'isolement de ces souches.

Les mécanismes possibles comprennent la réglementation de pH cytoplasmique sont: L'exclusion et / ou l'extrusion des protons, la production des exopolysaccharides et les changements d'hydrophobicité de la membrane plasmique. Dans plusieurs bactéries, comme *R. leguminosarum* *bv* *Trifolii* ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu (Correa et Barneix., 1997). Donc, la sélection des souches de *rhizobium* plus tolérante au faible pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité (Correa et Barneix., 1997).

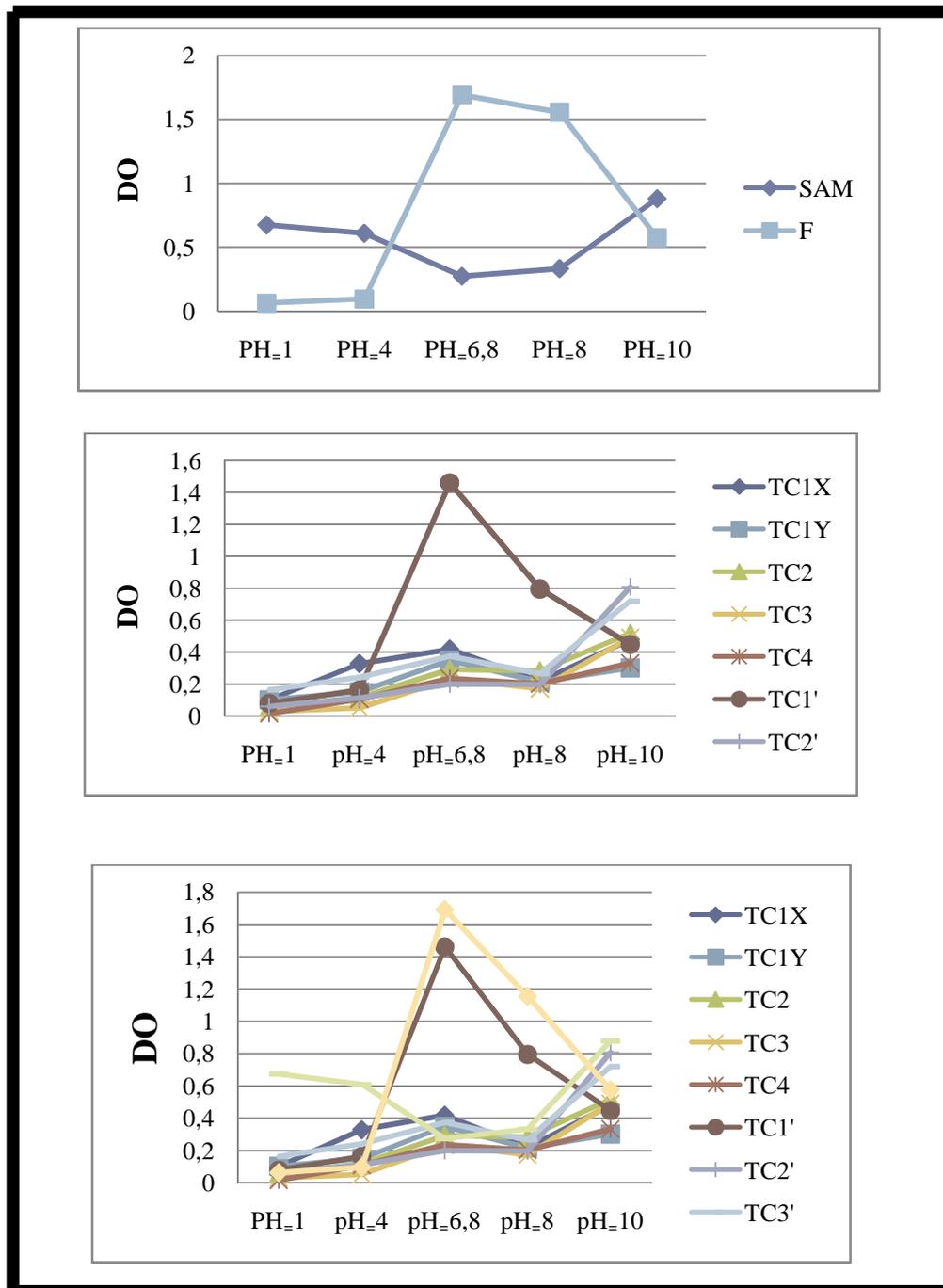


Figure16 : Effet du pH sur la croissance des isolats T= 24h

III-2-3-Effet de la température

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YMA, les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 4°C jusqu'à 44°C avec un optimum de croissance entre 28°C et 37°C.

- À 4°C, tous les isolats ont montré une croissance après 7 jours d'incubation.

Lipsanen et Lindström (1989) montrent qu'il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques.

- Tous nos isolats affichent une très bonne croissance entre 28°C et 37°C. Ces résultats rejoignent ceux de Moawad et Beck (1991) et Jordan (1984), Graham (1992) qui montrent que les rhizobia cultivent bien entre 20°C et 40°C.

-En ce qui concerne la température de 44°C nos isolats qui présentent une faible croissance. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que les rhizobia d'arbres légumineux ont l'aptitude de tolérer une température de 40°C (Lajudie *et al.*, 1994 ; Zahran *et al.*, 1994 ; Missbah El Idrissi.,1996).

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

Tableau 4 : Croissance des souches à des différentes températures

	4°C	28°C	37°C	44°C
TC1X	+	+ (2j)	+ (2j)	-
TC1Y	+	++	+	-
TC2	+(7j)	+	+	+(3j)
TC3	+	+	+	+
TC4	+	+	+	+
TC1'	+	++	+	+
TC2'	+(7j)	+	+	+
TC3'	+	++	+	++

Conclusion générale

La fixation biologique de l'azote, opérée par le système Légumineuse – BNL permet aux légumineuses de coloniser des milieux dégradés ou pauvres et d'enrichir le sol en matière azoté organique (engrais naturel), facilitant ainsi l'implantation d'autres espèces végétales et la réhabilitation de l'écosystème dégradé.

Dans ce travail nous avons mis en évidence à un isolement et une caractérisation, des bactéries nodulant la légumineuse (*Trigonella foenum-graecum* L.) cultivé dans la région de l'Est algérien, wilaya de Skikda.

Nous sommes procédé à un isolement et une caractérisation de 08 souches selon les techniques usuelles propres aux rhizobia selon Vincent., 1970 ; Somasegaran et Hoben., 1994.

La faible absorption des souches de rouge Congo et l'acidification de certaines souches sur le milieu YMA additionné de bleu de Bromothymol a confirmé sa croissance rapide et aussi la présence des enzymes spécifique au processus de la nodulation, tous ces tests nous peuvent orienter vers le genre *Rhizobium*.

L'étude des facteurs abiotiques (NaCl, pH et température) fait ressortir que: Les souches testées peuvent pousser dans un large intervalle de température compris entre 4°C et 44°C avec une température optimale de croissance entre 28°C et 37°C qui confirment une grande variabilité de la thermo-tolérance des souches.

Tous les isolats et souches de référence tolèrent des concentrations relativement élevées en NaCl (jusqu'à 10), Cette tolérance s'explique le plus souvent par la présence de molécules osmoprotectrices dans les cellules bactériennes. Elles sont aussi capables également de pousser sur un large intervalle de pH allant de 1 à 10 avec un pH optimum de croissance entre 6.8 et 8.

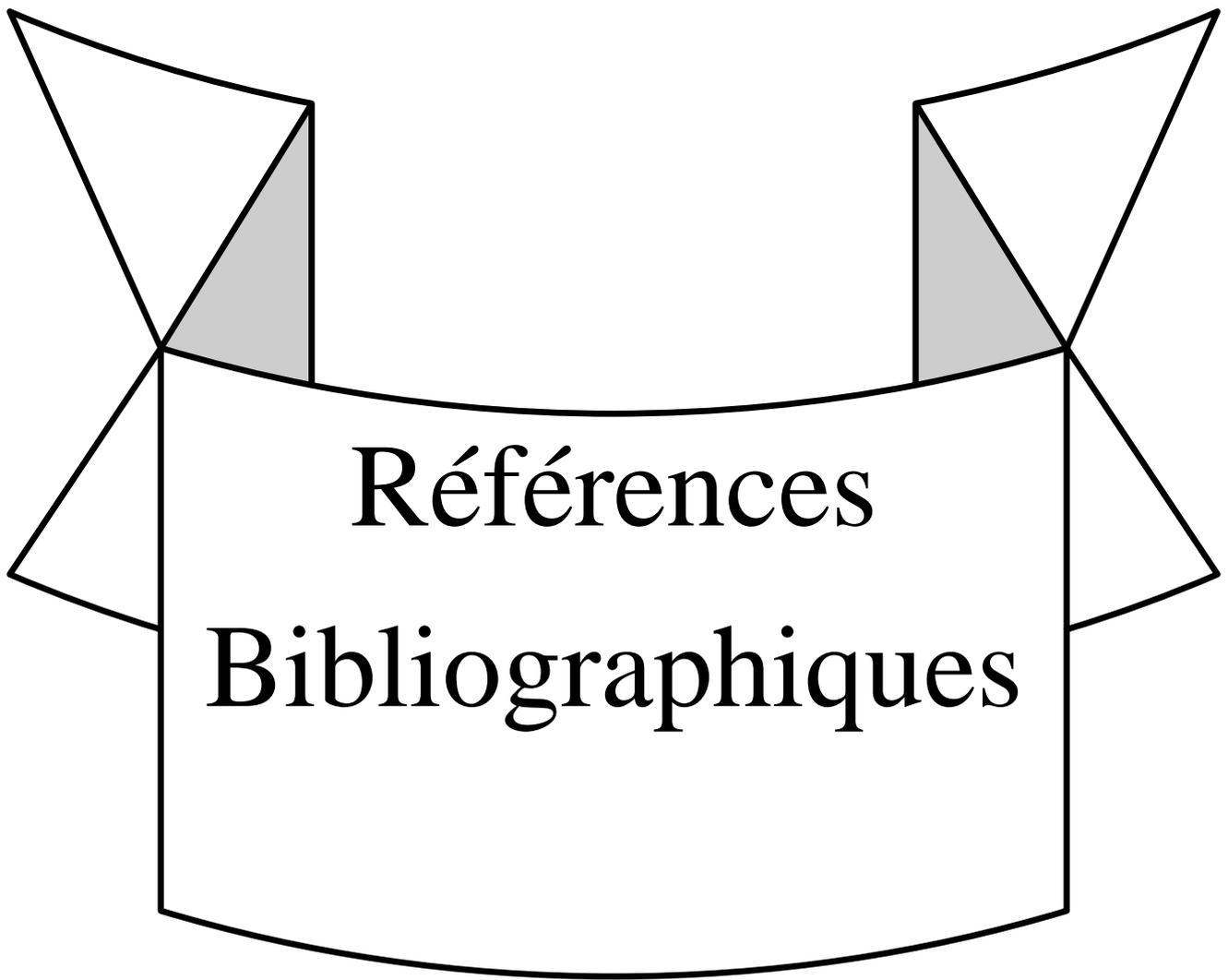
Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base génétique pour les travaux ultérieurs.

Sur le plan appliqué, 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.

Sur le plan écophysiological et moléculaire, on peut citer :

-La détermination du statut taxonomique des souches de *Trigonella* L étudiées et d'autres espèces endémiques algériennes par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S. L'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi un tout autre genre des protéobactéries.



Références

Bibliographiques

A

Appunu .C., Dhar .B.,2006: Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5(10) pp 842-845

Arreseigor C., Minchin F. R., Gordon A. J., Nath A. K., 1997: Possible cause of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in response to nitrate. J. Exp. Bot. **48**, pp 905-913.

B

BARBAULT Robert ., 2009: Ecologie Générale : structure et fonctionnement de la biosphère, 5ème édition, ed. Dunod, pp32,

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993: Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA(Ed), Syria, pp389.

Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A., Squartini A., 2004:Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. System Appl Microbial. 27, pp 462-468.

Benhizia Y., 2006: Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf.et *H. pallidum* Desf. Thèse de Doctorat d'Etat en Microbiologie appliquée de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.

Burnie G .,Forrester S .,Greig D .,Gust S.,Harmony M., Hobluy S. et al ., 2006 : Botanica Encyclopédie de botanique et d'horticulture . Edition Place des victoires. pp 896.

C

Chabbi R., 2010 : Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister: Biotechnologie végétale .Université Mentouri Constantine.

Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., DeVos P., Mergeay M., Vandamme P., 2001 : *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov. Isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Microbial. 51, pp 1729 - 1735.

Cooper J.E., 2007 : Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. Journal of Applied Microbiology. 103, pp 1355-1365.

Correa O.S., Barneix A.J., 1997: Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 13,pp 153-157.

Cronk ,Q., Ojeda ,I., Pennington, R.T., 2006 : Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology*. 9, pp 99-103.

D

Davet P., 1996 : Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Editions INRA. Paris.

Davidson I. A., Robson M. J., 1986: Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N₂-fixation, nodulation and growth of white clover. *Ann. Bot.* **57**, pp 331-338.

Denarie, J., Debelle, F., and Prome, J.C. 1996 : *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide Nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem.* 65, pp 503-535.

Diez,B., Fajardo,S., Puertas-Mejia,M .A.,del Rosario de Felipe,M.et Fernandez-Pascual,M. 2009 : Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain.*Arch Microbiol.*191, pp 35-46.

E

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

F

Fedelic ashish toppo., and Rachna akhand pathak.,2009 : Pharmacological actions and potential uses of *trigonella foenum- graecu m*: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* ,2(4), pp29-38.

G

Garrity.,2004 : *Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions*. *Can. J. Microbiol.* **38**, 475-484.

Guignard, J.L., Dupont, F., 2005 : Botanique. 13ème Edition Masson Paris.

Gustave , Heuzé ., 1861 : Livre Les plante fourragères .*Fenugrec*. pp437.

H

Hu C.Y et Lin L.P., 2003 :Characterisation and purification of hydrolytic enzymes in *Sinorhizobium fredii* CCRC15769. World J.microbial.biotech.19(5),pp515-522.

J

Jarvis, B. D. W., V. Van Berkum P., Chen W.X., Nour S. M., Fernandez M.P.,Cleyet-Marrel J. C.,et Gillis M., 1997 : Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, pp895-898.

Joffin, J.-N et le yral ., G.2006 :Microbiologie technique, Tome 1 :dictionnaire des techniques, 4ème edition CRDP d'aquaire.

Jordan D.C., 1984 :Family III.Rhizobiaceae Conn 1983.pp234-254.In :N.R.Kreig and J.H.

Holt(Ed.).Bergy's manual of systematic bacteriology .Vol.1 the Williams & Wlkins Co.

Judd ,W.S., Campbell ,C.S., Jules Bouharmont., Kellogg ,E.A., Stevens ,P., 2001.

Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

K

Kennedy I.R,Rigaud J et Trinchant J.C.,1975 .Nitrate reductase from bactéroïdes of *Rhizobium japonicum* :enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim.Biophy.Acta-Enzymol.*397 (1),pp 24-35.

Kneen B.E., La Rue T.A., 1983 : Cango red absorption by *Rhizobium leguminosarum*.

Applied and environmental microbiology .45 (1), pp340-342.

Baltimore., pp234-256.

L

Le journal canadien de microbiologie [http : /fr.spiritus-temporis.com/fabaceae/](http://fr.spiritus-temporis.com/fabaceae/)(12 Mai 2012).

Lindemann, W.C. et Glover, C.R., 2003 : Nitrogen Fixation by Legumes. [En ligne]. <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec10/lindemann.html> (page consultée le 30 janvier 2013).

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

M

Machrafi Y., 2001 : Inhibition de la symbiose Rhizobium –Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux . Mémoire pour l'obtention du grade de maître

Martinez-Molina E., Morales V.M., Hubbell D.J., 1979 : Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. 38(6), pp 1186-1188.

des sciences . Université Laval.

Mehani M ., Segni L ., 2012 : Antimicrobial Effect of Essential oil of plant *Trigonella foenum- graecum* on some Bacteria Pathogens . Word Academy of Science Engineering and Technology . 69, pp 358-360.

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

Missbah El Idrissi M., Auajjar N ., Belabed A., Dessaux Y., et Filali-Maltouf A., 1996 : Characterization of rhizobia isolated from carob tree (*Ceratonia siliqua*). J. Appl. Bacteriol. 80, pp 165-173.

Moawad, H., et Beck D., 1991 : Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field –grown lentil. Soil Biol. Biochem. 23, pp 917-925.

Moradi Kor ,N., Didarshetaban M.B ., Saeid H. R., 2013 : Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*. L.) as a valuable medicinal plant . International journal of Advanced Biological and Biomedical Research . 1(8) : pp 922-931.

Moschetti G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., 2005 : Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nod C* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarium* biovar *viciae*. Systematic and applied Microbiology. 28, pp 619-631.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C. 2001 : Nodulation of légumes by members of the α -sb class of Proteobacteria. Nature N° 411 pp 948-950.

P

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

Parker M. A., 2002 : Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium* and *Macroptilium*

species in northern Mexico. *Appl. Env. Microbiol.* **68**, pp 2044-2048.

Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M. (2004) : Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* **234**, pp201-262.

Perry ,J.J., staley ,J.T., Lory ,S., 2004 : Microbiologie. Edition Dunod, Paris.

Pousset, J., 2003 : Engrais verts et fertilité des sols. 2ème Edition Agri décisions, Paris.

Pujic P., Normand P., 2009 : La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofature* 298 pp 26-29.

Q

Quezel, P., Santa S., (1962) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France.

R

Rae D.L.N.,Giller K.F.,Yea A.R.,FlowerT.J.,2002 :The affects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chichpea(*Cicer arietinum*).*Annals of Botany.*89 ,pp563-570.

Raven ,P. H., Evert ,R. F., Eichlorn ,S. E., 2000 : Biologie végétale. La 6ème Edition de boeck ,Paris.

Raven., Evert., Eichhorn., 2007 : Biologie végétale. 2e édition. Edition de boeck. Paris France.pp 653-660.

Räzänen L.A., 2002: Biotic and abiotic factors infl uencing the development of N₂-fi xing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

Robledo M,Jiménez-Zurdo J.I,Velázquez E, Trujillo M.E, Zurdo-Pin eiro J.L ,Ramírez-Bahena M.H,Ramos B,Díaz-Mínguez J.M, Dazzo F, Martínez-Molina E,et MateosP. F.,2008 :Rhizobium cellulase CeCl₂ is essential for primary symbiotic infection of legume host roots .*Proc .Nalt.Acad.Sci.USA* 105,pp7064-7069.

S

Saadallah K., Drevon J-J., Abdelly C., 2001 : Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21,pp 627-634.

Sahgal, M. et Johri, B. N., (2003) : The changing face of rhizobial systematics. *current Science*. 84 (1), pp 43-48.

Sebbane N., 2007: Contribution à la caractérisation phénotypique et génotypique de rhizobia associés à différentes légumineuses de la région de Béjaïa. Thèse de Doctorat de l'Université Abderrahmane Mira. Béjaïa. Algérie.

Sherwood J. E., Truchet G. L., and Dazzo F. B., 1984: Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta*. 126 pp 540-547.

Singh B., Kaur R., Singh K., 2008 : characterization of Rhizobium strain isolated from the roots of trigonella foenum- graecum (fenugreek) .African Journal of biotechnology. 7(20), pp3671-3676.

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994: Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .pp 450. **Madigan M., Martink J., 2007 :** Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Edition Person Education France. pp 599-601, 676-681.

T

Teather , G .,and Wood, M., 1982 : Response of Lotus rhizobia to acidity And aluminum in liquid culture and in soil. *Plant Soil*. 107,pp 227-231.

V

Vale Matthieu M., (2006) : Quantification et prédiction de la minéralisation nette de l'azote du sol in situ, sous divers pédoclimats et systèmes de culture français, thèse n° 2367, INRA-France.

Vandamme, P., Pot V., Gillis M., De Vos P., Kersters K., and Swings G., 1996 : Polyphasique taxonomy ,a consensus approach to bacterial systematics . *Microbiol .Rev* . 60, pp 407-438.

Vessey ,J.K., Chemining ,G.N., 2006 : The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarium* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry* 38.

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

W

Weir, G. H., Z. Y. Tan, M. E. Zhu, E. T. Wang, S. Z. Han, and W. X. Chen. 2006 :Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus*

X

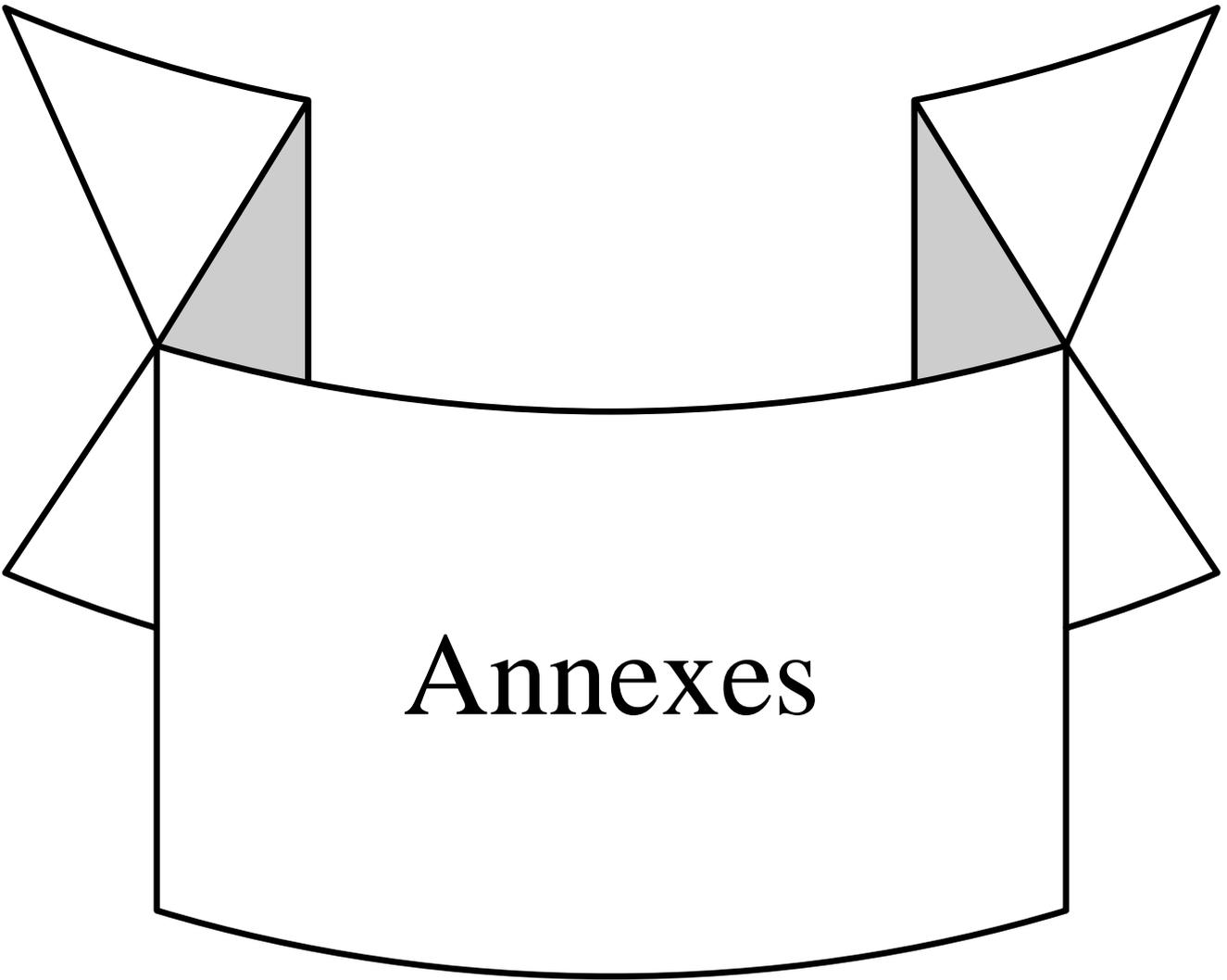
Xu L., M C., Ge Z., Cui J.,Li., et Fan H.,1995 :*Bradyrhizobium liaoningense* sp.nov. isolated from the root nodules of soybeans.Int.J.Syst.Bacteriol.45 ,pp706-711.

Z

Zahran H.H.L., Räsänen A.,Karsisto K.,et Lindstr m K.,1994 :Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-Page of rhizobia by osmotic and heat stress. W.J.Microbiol.Biotechnol.10,pp100-105.

Zahran H.H., 1999 : *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63,pp 968–989.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P., 2001: Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. pp 380-395.



Annexes

Annexe 1

Milieux de culture et solutions utilisées

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

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

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

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

Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de Rouge Congo	10 ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120 °C pendant 20 min

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

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

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de Bromothymol	5ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

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

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

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de BCP	10 ml
Agar	18g
pH	6,8

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

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

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0,87
pH	6,8

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

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

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0,87
Agar	18
pH	6,8

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

Annexe 2

Coloration de Gram

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

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

Annexe 3

Tableaux des différents résultats

Tableau a : résultat des lectures de la densité optique pour le test de la résistance au NaCl

	TC1X	TC1Y	TC2	TC3	TC4	TC1'	TC2'	TC3'	SAM	F
1	0.61	0.42	0.08	0.09	0.07	0.50	0.23	0.47	0.21	0.63
2	0.50	0.75	0.02	0.06	0.05	0.46	0.12	0.64	0.29	0.66
3	0.46	0.31	0.03	0.02	0.06	0.61	0.11	0.46	0.20	0.54
5	0.51	0.14	0.01	0.01	0.04	0.40	0.07	0.17	0.11	0.53
10	0.13	0.05	0.008	0.04	0.03	0.11	0.01	0.08	0.13	0.02

Tableau b : résultat des lectures de la densité optique pour le test de la résistance au pH

	TC1X	TC1Y	TC2	TC3	TC4	TC1'	TC2'	TC3'	SAM	F
pH=1	0,102	0,102	0,057	0,029	0,016	0,079	0,06	0,164	0,674	0,063
pH=4	0,328	0,151	0,116	0,052	0,107	0,163	0,113	0,243	0,609	0,096
pH=6,8	0,418	0,349	0,293	0,233	0,236	1,46	0,199	0,375	0,273	1,692
pH=8	0,217	0,215	0,283	0,172	0,202	0,795	0,197	0,266	0,332	1,155
pH=10	0,479	0,301	0,518	0,491	0,332	0,447	0,808	0,72	0,879	0,575

Tableau c : présente l'effet de la température

	4°C	28°C	37°C	44°C
TC1X	+	+(2j)	+(2j)	-
TC1Y	+	++	+	-
TC2	+(7j)	+	+	+(3j)
TC3	+	+	+	+
TC4	+	+	+	+
TC1'	+	++	+	+
TC2'	+(7j)	+	+	+
TC3'	+	++	+	++

Caractérisation phénotypique des isolats nodulants *Trigonella foenum-graecum* L.

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

Cette étude consiste à mettre en évidence les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Trigonella foenum graecum* L. cultivé dans la région du Bin El Ouidenne commune de Tamalousse wilaya de Skikda, afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique existante entre les 08 isolats en présence de deux souches de référence.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique, suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests, biochimiques et des tests physiologiques.

Sur la base des caractères étudiés, les souches isolées sont très proches au groupe des BNL.

Mots clés : caractérisation, *Trigonella foenum graecum* L., Phénotypique, BNL

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Constantine I.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *N.Riah* (Maitre de Conférence - UFM Constantine).

Rapporteur : *R.Chabbi* (Maitre-Assistant - UFM Constantine).

Examineur : *I.Meriane* (Maitre-assistante- UFM Constantine).

Date de soutenance : 13/06/2016