

**République Algérienne Démocratique et populaire**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE**  
**LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Mentouri Constantine**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

N° d'ordre : 001/2010  
N° de Série : 005/2010

**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme**  
**de Magister (Ecole Doctorale)**

**Option : Biotechnologie végétale**

Présenté par :

**Rabah CHABBI**

**Thème**

**Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L.**  
**(Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien.**

**Soutenu le : 14/01/2010**

**Devant le jury :**

**Président : Mm. N. Khalfallah**

**Professeur. Université de Constantine**

**Rapporteur : Mr. Y. Benhizia**

**Maître de Conférences. Université de Constantine**

**Examineurs : Mr. A. Benguedouar**

**Professeur. Université de Constantine**

**Mr. A. Boudemagh**

**Maître de Conférences. Université de Constantine**

**Année universitaire : 2008-2009**

A ma mère,  
A mon père,  
A mes sœurs.

A toute ma famille.

A toutes et à tous, qu'ils trouvent en ce mémoire, ma  
profonde gratitude, mon éternelle reconnaissance.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude, ma plus chaleureuse amitié ainsi que mon plus grand respect au Dr. Benhizia Yacine qui a assuré la direction de ma thèse. Ces deux années passées à ses côtés ont été riches en enseignement, en travail efficace et également en franche rigolade. Merci de m'avoir permis de commencer ma carrière de chercheur dans de si bonnes conditions.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude et mes vifs remerciements à Madame Nadra KHALFALLAH, Professeur à l'université Mentouri Constantine, pour sa disponibilité et l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Amar BENGUEDOUAR, Professeur à l'université Mentouri Constantine, pour m'avoir accepté dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne, ainsi que sa participation au jury d'évaluation de cette thèse.

Mes remerciements et toute ma reconnaissance s'adressent également à Monsieur Allaoueddine BOUDEMAGHE, Maître de conférences à l'université Mentouri Constantine, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Douadi KHELIFI pour m'avoir ouvert son laboratoire sans aucune restriction et avec une grande modestie.

Au Docteur Nadjib BOURGHOUD et le Docteur Mohamed Laid HADDI pour les nombreuses aides.

A mademoiselles Asma TORCHE, Maître assistant à l'université de Guelma et Razika Gharzouli, Maître assistant à l'université Mentouri Constantine pour leurs nombreuses orientations durant la préparation de ce travail.

Merci encore à celles qui n'ont été que de passage mais avec qui j'ai passé de réels bons moments au coin d'une paillasse, d'une hotte ou au détour d'un café.

Merci à mes collègues du laboratoire d'Ecologie Microbienne pour leur soutien matériel et morale.

تم هذا العمل بهدف تقييم و وصف التنوع المظهري المتواجد ضمن مجتمعات البكتيريا المتعايشة المعزولة من عقد جذرية لثلاث تجمعات من نبات الحلبة بامية في مناطق من الشرق الجزائري. تقنية SDS-PAGE أظهرت مستوى اختلاف مظهري بروتيني كبير بين العزلات. هذه التقنية سمحت بالتخمين في امكانية حدوث اصابات جذرية متعددة عند نبات الحلبة *Trigonella L*. كل السلالات كانت جيدة الاصابة مع الحلبة مع قدرة متغيرة في تثبيت الازوت, تتجلى من خلال مستوى النمو و عدد السيقان النامية في كل جرة. النمو السريع للسلالات اضافة الى استعمال المواد الكربونية أظهرت سلوكا مشابها ل *Rhizobium*, من جهة أخرى كانت مشابهة ل *Gammaproteobacteria*, جد مقاومة للمعادن الثقيلة و المضادات الحيوية. تحمل مجال واسع ل NaCl, ال pH و درجات الحرارة تم تسجيله لكل العزلات. يمكننا الاعتماد على أساس القدرة على تثبيت الأزوت و تحمل القلوية, عزلات كانت مؤهلة لاستعمالها لتلقيح الحقل.

#### الكلمات المفتاحية :

وصف , متعايش,*Trigonella L*,*Rhizobium*,*Gammaproteobacteria*.

## Résumé :

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique qui existe au sein d'une collection de symbiotes isolés à partir des nodosités de trois populations de Fenugrec issues de différentes régions de l'Est algérien.

La SDS page a révélé un grand niveau de polymorphisme protéique entre les isolats. Cette technique nous a permis de mettre en évidence la possibilité d'une infection multiple chez *Trigonella L.*

Toutes les souches sont infectives vis-à-vis de *Trigonella L.* avec une efficacité relative, qui est traduite par un bon niveau de croissance des pieds obtenus.

La croissance rapide des souches ainsi que l'assimilation des substrats carbonés a révélé des profils comparables à ceux du *Rhizobium*. A l'opposé, elles se sont révélées, comme les Gammaproteobactéria, très résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques. Une large tolérance à l'NaCl, au pH et à la température a été notée pour l'ensemble de la collection.

Nous avons repéré, sur la base du potentiel fixateur d'azote et la tolérance à l'alcalinité, des candidats assez performants qui peuvent être utilisés pour l'inoculation au champ.

**Mots clés :** Caractérisation, Symbiote, *Trigonella L.*, *Rhizobium*, Gammaproteobacteria.

## **Abstract:**

This work has been realized in order to evaluation and characterisation of the phenotypical diversity that exists within a collection of symbiots isolated from nodosities of three Fenugreek populations originated from different regions of east Algeria.

The SDS page has revealed a great level of proteic polymorphism between the isolates. This technique has allowed us to highlight the possible multiple infection among *Trigonella* L.

All the strains are infective towards *Trigonella* L with a relative efficiency that is reflected by a good growing level of the obtained feet.

The fast growth of the strains and the assimilation of the charred substratum have revealed profiles that are comparable to those of *Rhizobium*. In contrast, the strains have manifested, like the Gammaproteobacteria, a great resistance to heavy metals and antibiotics. A great tolerance to NaCl, pH, and temperature variation has been noticed for the whole collection.

We have defined, on the base of the Azote fixative potential and the tolerance of alkalinity, candidates that are efficient enough to be used for inoculation in the field.

## **Keywords:**

Characterization, Symbiots, *Trigonella* L, *Rhizobium*, Gammaproteobacteria.

## Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I-Azote .....</b>	<b>3</b>
<b>I-1-Cycle de l'azote .....</b>	<b>3</b>
<b>I-1-1- La fixation de l'azote .....</b>	<b>3</b>
<b>I-1-2- Ammonification.....</b>	<b>4</b>
<b>I-1-3- Nitrification .....</b>	<b>4</b>
<b>I-1-4- Dénitrification.....</b>	<b>5</b>
<b>I-2- Fixation biologique de l'azote.....</b>	<b>5</b>
<b>I-2-1- Les fixateurs libres .....</b>	<b>6</b>
<b>I-2-2- Les fixateurs symbiotiques.....</b>	<b>6</b>
<b>I-2-3- Mécanisme moléculaire de la fixation.....</b>	<b>7</b>
<b>I-3- La molécule clé de la fixation d'azote.....</b>	<b>9</b>
<b>-Les nitrogénase alternatives.....</b>	<b>9</b>
<b>I-4- La leghémoglobine .....</b>	<b>10</b>
<b>II- La symbiose .....</b>	<b>11</b>
<b>a- Définition générale et héstorique .....</b>	<b>11</b>
<b>b-Endo- et Ecto .....</b>	<b>11</b>
<b>II-1- Symbiose <i>Trigonella</i>-bactérie.....</b>	<b>11</b>
<b>II-1-1- Le partenaire végétale.....</b>	<b>11</b>
<b>a- Les légumineuses .....</b>	<b>11</b>
<b>b- La nodulation chez les légumineuses .....</b>	<b>13</b>
<b>c- Intérêts scientifiques des légumineuses .....</b>	<b>13</b>
<b>d- Intérêt agronomique de légumineuses .....</b>	<b>13</b>
<b>e- Intérêt alimentaire des légumineuses.....</b>	<b>13</b>
<b>II-1-1-1- <i>Trigonella</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>a- Historique de la plante .....</b>	<b>14</b>
<b>b-Germination des graines.....</b>	<b>16</b>
<b>c- Développement de la graine .....</b>	<b>16</b>
<b>d- Origine de la plante .....</b>	<b>16</b>
<b>e- Distribution de la plante .....</b>	<b>16</b>
<b>f- Génétique de la plante .....</b>	<b>16</b>

<b>g- Morphologie de la plante .....</b>	<b>17</b>
- Les Tiges .....	17
- Les Fleurs .....	17
- Les gouses .....	17
<b>II-1-2- Le partenaire bactérien... .....</b>	<b>18</b>
- Rhizobium.....	18
- Taxonomie des rhizobiums.....	18
<b>III- La nodulation.....</b>	<b>24</b>
<b>III-1- Ontogenèse d'un nodule .....</b>	<b>24</b>
III-1-1-Préinfection .....	24
III-1-2- Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces .....	24
III-1-3- Attachement .....	25
III-1-4-Recourbement des poils absorbants et formation du cordon d'infection.....	25
III-1-5- Développement du nodule et libération des bactéries.....	26
<b>III-2- Différentiation des zones d'un nodule .....</b>	<b>26</b>
<b>III-3- Formes des nodules .....</b>	<b>27</b>
<b>IV- Génétique de la symbiose et de la nodulation .....</b>	<b>29</b>
<b>IV-1-Les flavonoïdes et la diversité des facteurs Nod .....</b>	<b>29</b>
IV-1-1-Les flavonoïdes :.....	29
IV-1-2-Les facteurs Nod .....	29
<b>IV-2- Les gènes de nodulation .....</b>	<b>31</b>
IV-2-1- Les gènes <i>nod</i> communs .....	31
IV-2-2- Les gènes de spécificité d'hôte .....	32
IV-2-3-Les gènes <i>nodD</i> .....	32
<b>IV-3- Aspects moléculaires de la fixation d'azote .....</b>	<b>33</b>
IV-3-1- Les gènes <i>nif</i> .....	33
IV-3-2- Les gènes <i>fix</i> .....	33
<b>IV-4- Rôle symbiotique des polysaccharides de surface .....</b>	<b>33</b>
IV-4-1- Les exopolysaccharides (EPS).....	33
IV-4-2- Les polysaccharides capsulaires (KPS).....	34
IV-4-3- Les lipopolysaccharides (LPS).....	34

## Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

I- Isolement des bacteries nodulant le fenugrec ( <i>Trigonella</i> ) .....	36
I-1- Collecte des nodules .....	36
I-2- Conservation des nodules .....	37
I-3- Isolement des souches à partir des nodules .....	37
I-3-1- Stérilisation de nodules .....	37
I-3-2- Ecrasement des nodules .....	38
I-3-3- Isolement des souches .....	38
II- Caractères culturaux .....	38
II-1- Principaux milieux de culture utilisés .....	38
II-2- Purification des isolats .....	39
II-3- Examens microscopiques et macroscopique.....	39
a- Coloration de Gram .....	39
b- Examen de la mobilité .....	40
II-4- Conservation des souches .....	40
II-5- Authentification des isolats.....	42
II-5-1- Test de nodulation .....	42
II-5-2- Préparation des jarres de Léonard .....	42
II-5-3- Préparation du mélange : Sable – Vermiculite .....	42
II-5-4- La récolte des graines .....	43
II-5-5- Stérilisation des graines .....	43
II-5-6- Germination des graines .....	43
II-5-7- Inoculation des jarres .....	44
III- Caractérisation phénotypique des isolats .....	44
III-1- Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> .....	44
III-1-1- Test du 3-cétolactose .....	44
III-1-2- Précipitation du glycérophosphate de calcium (Hofer, 1994) .....	45
III-1-3- Croissance sur Litmus milk.....	46
III-2- Tests nutritionnels .....	46
III-2-1- Utilisation des sucres comme seul source de carbone .....	46
III-2-2- Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote .....	46
III-2-3- Besoin en vitamine .....	47
III-3- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes) .....	47

III-3-1- Réduction des nitrates .....	47
III-3-2- Hydrolyse de l'urée .....	47
III-3-3- Activité pectinolytique .....	47
III-3-4- Activité cellulolytique .....	47
III-4- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques).....	48
III-4-1- Tolérance au NaCl .....	48
III-4-2- Effet de la température .....	48
III-4-3- Effet de pH .....	48
III-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques.....	48
III-5-1- Métaux lourds .....	48
III-5-2- Antibiotiques .....	48
III-6- Sensibilité aux phages .....	49
III-6-1- Isolement des bacteriophages .....	49
III-6-2- Analyse des phages .....	50
IV- Determinacion des profils protéiques par SDS-PAGE .....	51
IV -1- Protocole .....	51
- Préparation des plaques de gel.....	51

## Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

Introduction .....	52
I- Caractères cultureux .....	52
- Detection de la production des EPS.....	53
- Examen microscopique.....	53
- Mobilité des souches.....	53
II- Authentification des isolats .....	53
III- Caractérisation phénotypique des isolats .....	60
III-1- Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> .....	60
III-1-1- Test du 3-céto lactose .....	60
III-1-2- Précipitation du ca-glycérophosphate.....	60
III-1-3- Croissance sur Litmus milk .....	60
III-2- Tests nutritionnels .....	60
III-2-1- Source de carbone.....	60
III-2-2- Source d'azote .....	61

<b>III-2-3- Besoin en vitamines .....</b>	<b>66</b>
<b>III-3- Tests biochimiques .....</b>	<b>69</b>
<b>III-3-1- Réduction des nitrates .....</b>	<b>69</b>
<b>III-3-2- Hydrolyse de l'urée .....</b>	<b>70</b>
<b>III-3-3- Activité pectinolytique.....</b>	<b>70</b>
<b>III-3-4-Activité cellulolytique .....</b>	<b>71</b>
<b>III-4- Tests physiologiques .....</b>	<b>73</b>
<b>III-4-1- Tolérance au NaCl .....</b>	<b>73</b>
<b>III-4-2-Température de croissance.....</b>	<b>76</b>
<b>III-4-3- Tolérance au pH .....</b>	<b>78</b>
<b>III-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques .....</b>	<b>81</b>
<b>III-5-1- Résistance aux métaux lourds .....</b>	<b>81</b>
- Résistance au mercure.....	82
- Résistance au plomb.....	83
<b>III-5-2- Résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>83</b>
<b>III-6- La sensibilité aux phages.....</b>	<b>87</b>
<b>IV-Détermination du profil protéique par SDS-PAGE.....</b>	<b>88</b>
- Etablissement d'électrophorégramme.....	89
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>91</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>93</b>
<b>Annexe</b>	

## Introduction

Les organismes vivants dans leur environnement sont en interaction permanente les uns avec les autres. Certaines de ces interactions sont stables dans le temps et ont un impact sur le déroulement de la vie de l'un ou des deux organismes impliqués. D'un point de vue étymologique ces interactions peuvent être nommées « symbiose ».

Dans le règne végétal, parmi les symbioses les plus importantes, on distingue les endosymbioses racinaires formées entre des plantes légumineuses et certains micro-organismes telluriques. Au cours de ces interactions, les micro-organismes fournissent au végétal hôte des composés nécessaires à leur croissance en retour la plante fournit des composés carbonés issus de la photosynthèse.

De par leur importance économique, agronomique et écologique, les légumineuses (Fabacées) constituent un enjeu à caractère stratégique pour plusieurs pays, ceux du sud en particulier.

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien.

De nombreuses espèces de légumineuses sont utilisées comme ressources pour l'alimentation humaine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille ...) et animale (luzernes, trèfles, sulla...) et en médecine (fenugrec...). D'autres légumineuses jouent un rôle écologique important dans la sauvegarde et la fertilisation naturelle des sols. L'intérêt des légumineuses est directement lié à la capacité de nombre d'entre elles d'établir une association symbiotique spécifique avec des bactéries nodulant les légumineuses (BNL) (Moulin, 2002). Le rhizobium induit sur la plante hôte la formation d'un organe spécialisé (le nodule) à l'intérieur duquel la bactérie fixe l'azote atmosphérique. Cette symbiose constitue un procédé précieux permettant d'introduire de l'azote combiné dans les sols, pour les enrichir en azote et améliorer leur fertilité, réduisant ainsi l'utilisation des engrais chimiques et autres intrants agricoles responsable de la dégradation des sols et de l'environnement.

L'utilisation des légumineuses est préconisée pour la restauration des sols dégradés, en jouant le rôle de plantes pionnières facilitant l'implantation d'autres espèces végétales (Dommergues *et al*, 1999). Pour cela, il est particulièrement recommandé de rechercher des couples symbiotiques "légumineuses-rhizobium" les plus adaptés et les plus efficaces, pour les introduire en vue de coloniser ces sites pauvres.

La région de l'Est algérien a un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, sub-humide et semi aride. Elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées, parmi elles les espèces du genre *Trigonella L.*

En Algérie, la diversité des bactéries nodulant les légumineuses reste peu étudiée (Sebbane, 2007).

Ces dans ce contexte que s'intègre notre travail, où nous avons entrepris pour la première fois une caractérisation des microsymbiotes de la plantes légumineuse et médicinale *Trigonella L* (fenugrec) poussant dans différentes régions de l'Est algérien.

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- isolement des bactéries à partir des nodules,
- étude morphologique et microscopique des isolats,
- un test de nodulation,
- une étude comparative entre les isolats des espèces cultivées selon leur écosystème par une caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests :
  - tests distinctifs entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*,
  - tests nutritionnels (source de carbone, source d'azote, besoin en vitamine),
  - recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, pectinase, uréase, cellulase),
  - effet des facteurs abiotiques (pH, T°, NaCl),
  - recherches des concentrations inhibitrices par les métaux lourds et les antibiotiques.
- Analyse des profils protéiques par SDS-PAGE.

# **Chapitre I**

## **Revue Bibliographique**

## **I- Azote**

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. Ce nom est paradoxal, d'ailleurs : il vient du préfixe « a- » privatif et du radical grec « ζῷον » (zoot) vivant – alors que l'azote est nécessaire à la vie (Pujic, 2009).

L'azote est un élément présent en grande quantité chez les êtres vivants. La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de diazote ( $N_2$ ) atmosphérique (Peret, 2007), 78% en volume, est un gaz incolore et inodore (Hopkins, 2003).

La réserve principale d'azote terrestre est la lithosphère (98% de l'azote total) et non l'atmosphère (Roger, 1996).

L'élément azote (N) est un constituant essentiel du protoplasme (Madigan *et al.*, 2007). Tous les organismes vivants ont besoin de cet élément pour synthétiser les protéines et les acides aminés (Tortora *et al.*, 2003). C'est aussi un des composants des quatre bases (adénine, thymine, guanine, cytosine) impliquées dans la constitution des nucléotides, unités de l'ADN et de l'ARN (Meyer *et al.*, 2004), présent dans de nombreuses enzymes et dans le noyau tétrapyrrolique des chlorophylles ... (Tourte *et al.*, 2005).

L'azote est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il constitue très fréquemment le facteur limitant principal pour la production végétale agricole (Roger, 1996). Il peut représenter jusqu'à 7% de la matière sèche et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif (Tourte *et al.*, 2005). Les carences azotées dans le sol sont souvent le principal facteur limitant la croissance des plantes (Raven *et al.*, 2007).

### **I-1- Cycle de l'azote**

L'azote total est généralement réparti dans trois ensembles principaux : l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins, 2003).

Les trois principales étapes de ce cycle sont : l'ammonification, la nitrification et l'assimilation (Raven *et al.*, 2007).

#### **I-1-1- La fixation de l'azote**

Les plantes supérieures ne fixent pas l'azote atmosphérique (Guignard, 2000). Les organismes qui fixent l'azote atmosphérique sont tous des micro-organismes telluriques,

Bactéries, Cyanobactéries et quelques Mycètes lévuriformes. Ce rôle des micro-organismes est connu depuis le XIX<sup>e</sup> siècle (Tourte *et al.*, 2005).

On appelle fixation de l'azote le processus par lequel ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac (Tortora *et al.*, 2003).

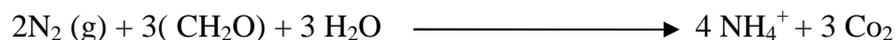
La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue le principal mécanisme d'incorporation d'azote fixé dans la biosphère, elle incorpore tous les ans 1-2 .10<sup>14</sup> g d'azote. À titre de comparaison, la moitié de cette quantité est fixée industriellement (Svistoonoff, 2003).

Dans un système biologique fixateur d'azote, les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N<sub>2</sub> et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères : pression de 250 à 1000 atm de N<sub>2</sub> et température de 450°C (PERET, 2007).

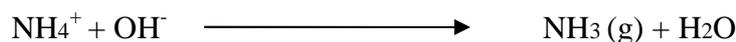
### **I-1-2- Ammonification**

L'azote protéique microbien amené par la fixation va être ensuite minéralisé ainsi que les protéines des végétaux et animaux faisant retour au sol après leur mort (par phénomène de putréfaction qui est une décomposition bactérienne d'un cadavre, d'un organisme mort) et donner un terme final de l'ammoniaque.

La réaction chimique type est :



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



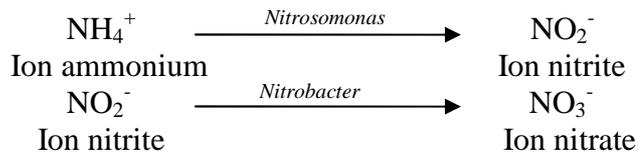
La réaction nécessite un apport d'énergie de la photosynthèse.

### **I-1-3- Nitrification :**

Chez la majorité des plantes supérieures, la source d'azote est représentée par le nitrate contenu dans les sols, venant soit de la minéralisation par décomposition des matières organiques soit par l'apport de nitrates par l'intermédiaire d'engrais azotés (Tourte *et al.*, 2005).

La nitrification, soit l'oxydation de NH<sub>3</sub> en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, est couramment réalisée dans les sols bien drainés, à pH neutre, suite à l'activité des bactéries nitrifiantes (Madigan *et al.*, 2007). La première étape de la formation du nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite NO<sub>2</sub><sup>-</sup> par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*. Le nitrite est

ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter* (Hopkins, 2003). Selon les réactions suivantes :



#### I-1-4- Dénitrification

Un processus anaérobie au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux  $\text{N}_2$  et l'oxyde d'azote  $\text{N}_2\text{O}$ , qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.*, 2007). C'est la principale voie de formation biologique de  $\text{N}_2$ . De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pracoccus*, *Pseudomonas*. (Madigan *et al.*, 2007)

#### I-2- Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de  $\text{N}_2$  est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. Dans les écosystèmes cultivés, la fixation de  $\text{N}_2$  et les apports d'engrais azoté constituent les apports pouvant compenser les exportations par les récoltes et les pertes dues à des activités microbiennes (volatilisation et dénitrification). En absence de fertilisation, la fixation de  $\text{N}_2$  est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger *et al.*, 1996).

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkin, 2003).

Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres et ne requièrent pas d'hôte pour effectuer le processus. En revanche, d'autres fixateurs d'azote sont symbiotique et fixe l'azote seulement en association avec certaines plantes (Madigan *et al.*, 2007).

### **I-2-1- Les fixateurs libres**

On trouve des bactéries de ce type surtout dans les prairies ; elles sont en forte concentration dans la rhizosphère (Tortora *et al.*, 2003). A ce groupe appartiennent des bactéries aérobies et anaérobies, ainsi que des représentants des bactéries phototrophes (*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Chlorobium* et *Rhodomicrobium*) et des cyanobactéries, en particulier celles qui forment des hétérocystes (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Colothrix*, *Rivularia*) (Richter, 1993).

La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer de grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol, la réduction de l'azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucides disponible (Tortora *et al.*, 2003).

Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique est néanmoins considérable (Tortora *et al.*, 2003).

### **I-2-2- Les fixateurs symbiotiques**

La réduction de l'azote est très exigeante en énergie : il faut 16 molécules d'ATP (donneur d'énergie dans les cellules) pour réduire une molécule d'azote. C'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (Dénarié, 2000).

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996).

Les espèces fixatrices d'azote réellement, symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les *Rhizobium*, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (Pelmont, 1995).

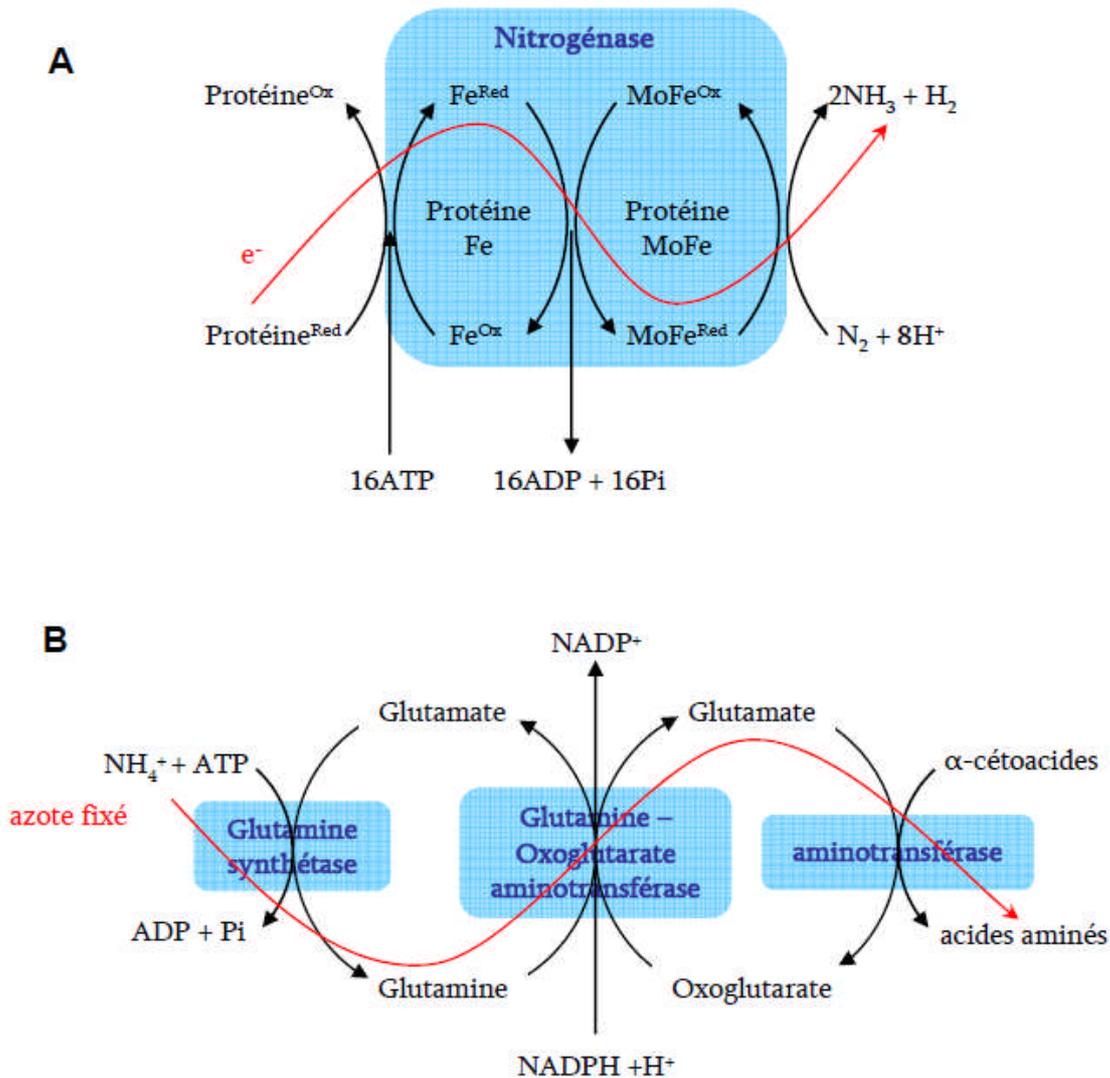
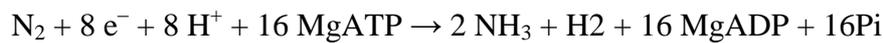
Les bactéries de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (Tortora *et al.*, 2003). Mais la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant des bactéries du sol, les *Rhizobium*, aux légumineuses (Dénarié, 2000).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules (Hopkins, 2003). Les plantes concernées en profitent, en utilisant les produits de la fixation bactérienne de l'azote. En contrepartie, la plante hôte fournit aux

bactéroïdes des composés carbonés, de l'énergie, ainsi que les mécanismes de protection nécessaires (Richter, 1993).

### I-2-3- Mécanisme moléculaire de la fixation

La fixation de l'azote est une réaction de réduction de l'azote moléculaire  $N_2$  en ammoniac  $NH_3$  (ou  $NH_4^+$ ). L'équation de la réaction chimique est :



**Figure1:** Mécanismes biochimiques impliqués dans la fixation de l'azote (Godfroy, 2008).

**A-** mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la Nitrogénase.

**B-** cycle Glutamine Synthétase/Glutamine – Oxoglutarate Aminotransférase (GS-GOGAT) qui permet l'assimilation de l'azote fixé dans le métabolisme de la cellule.

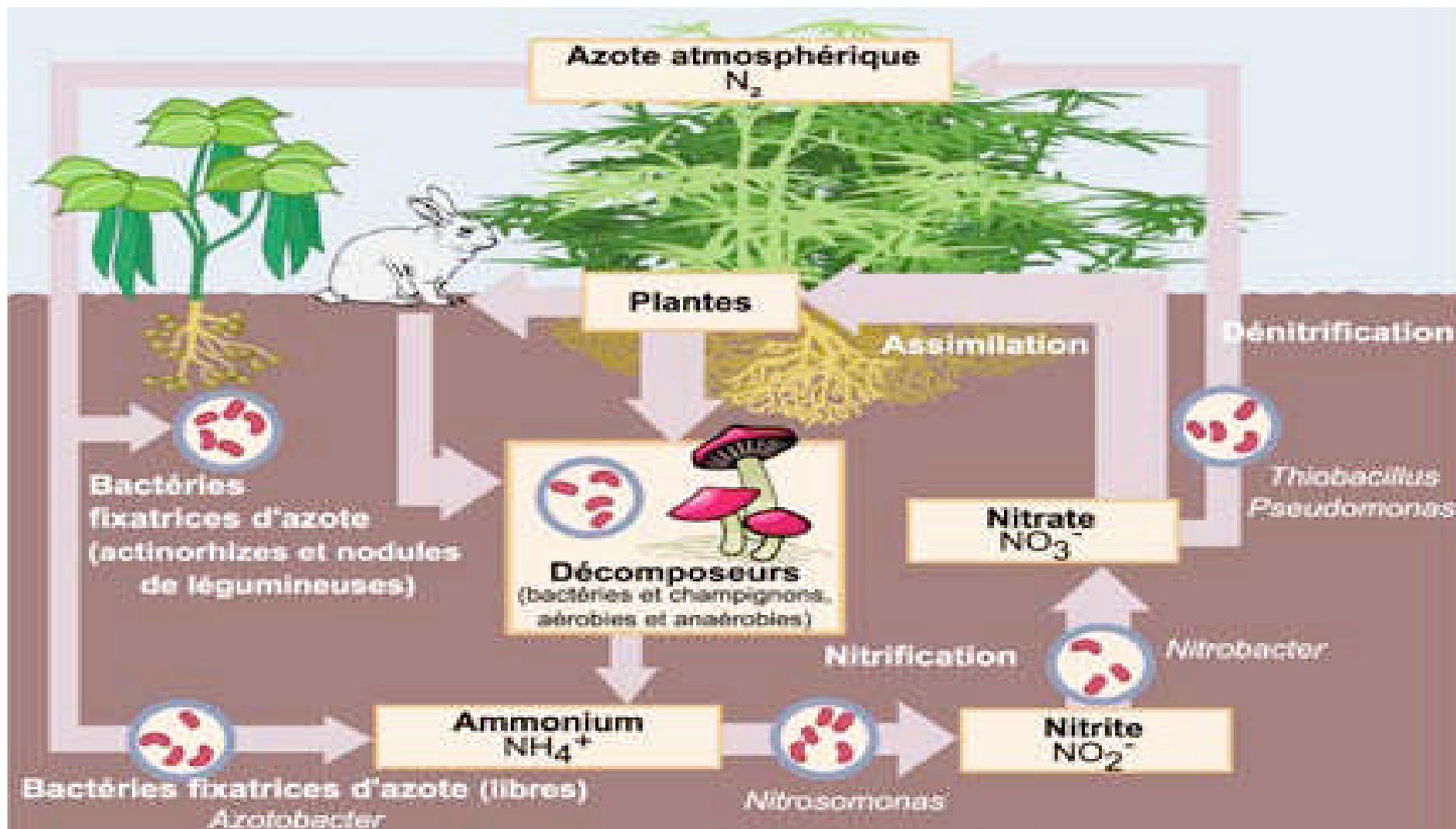


Figure 3: Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic, 2009)

### **I-3- La molécule clé de la fixation d'azote**

Au cours de la fixation de l'azote,  $N_2$  est réduit en ammoniac qui est ensuite converti en molécule organique. Le processus de réduction est catalysé par le complexe enzymatique nitrogénase (Madigan *et al.*, 2007).

La nitrogénase (ATP-dépendante), enzyme-clé de la fixation de l'azote, a été isolée de bactéries aérobies (*Azotobacter*) et anaérobies (*Clostridium*), de photobactéries (*Rhodospirillum*) et de cyanobactéries, ainsi que de bactéroïdes (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) (Richter, 1993). Malgré la diversité des organismes fixateurs d'azote, toutes les nitrogénase connues sont construites sur le même modèle et ont des caractères communs (Pelmont, 1995).

La nitrogénase est un complexe protéique multi-mérique composé de deux protéines de taille différente (Hopkins, 2003) nommées dinitrogénase ou protéine **I** (tétramère de 220 KDa), est constituée de deux sous-unités  $\alpha$  et deux sous-unités  $\beta$ , et dinitrogénase réductase ou protéine **II** (homodimère de 64 KDa) (Madigan *et al.*, 2007; Duhoux *et al.*, 2004). Les deux composants contiennent du fer, et la dinitrogénase contient également du molybdène. Le fer et le molybdène de la dinitrogénase sont situés dans un cofacteur nommé FeMo-co. La composition exacte du complexe FeMo-co est  $MoFe_7S_8$  homocitrate qui est présent en deux copies par molécule de nitrogénase (Madigan *et al.*, 2007).

L'un des problèmes les plus cruciaux auxquels les organismes fixateurs d'azote doivent faire face est la sensibilité de la nitrogénase à l'oxygène moléculaire (Hopkins, 2003). Les deux composants de la nitrogénase sont irréversiblement inactivés par l'oxygène (Hopkins, 2003 ; Duhoux *et al.*, 2004). Le maintien d'une faible pression partielle en oxygène dans le nodule est donc crucial. Dans le nodule des légumineuses, il est assuré par :

- une barrière à la diffusion de l'oxygène située dans le cortex interne du nodule,
- une respiration bactérienne rapide,
- la présence de leghémoglobine, protéine qui facilite le transport de l'oxygène aux bactéroïdes, à une faible pression partielle, sans endommager le complexe nitrogénasique. (Duhoux *et al.*, 2004).
- **Les nitrogénase alternatives**

Quelques bactéries fixatrices d'azote produisent des nitrogénases sans molybdène dans certaines conditions de croissance. Ces nitrogénases alternatives contiennent soit du vanadium et du fer, soit du fer seul à la place du molybdène.

Les nitrogénases alternatives ne sont pas synthétisées lorsque suffisamment de molybdène est présent.

Les nitrogénases alternatives fonctionnent comme une sauvegarde assurant que la fixation de  $N_2$  peut toujours se produire quand le molybdène est limitant dans un habitat. (Madigan *et al.*, 2007).

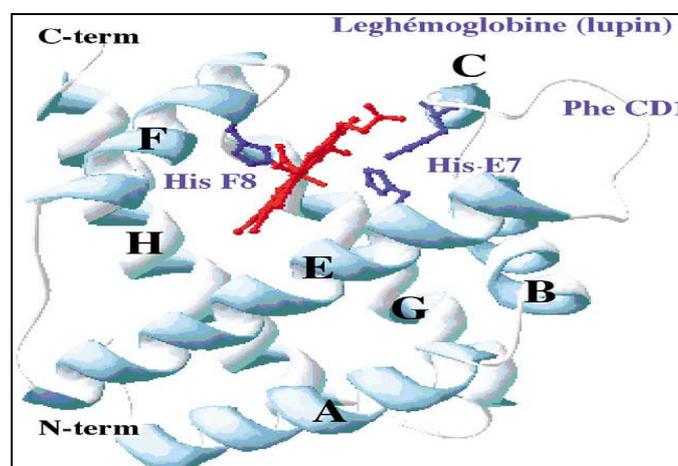
#### I-4- La leghémoglobine

Le groupe des hémoglobines végétales symbiotiques, ou leghémoglobines, est connu depuis longtemps et a été particulièrement bien étudié (Wajcman, 2002).

C'est une chromoprotéine formée de deux sous unités, de structure comparable aux globines de l'hémoglobine ou de myoglobine (Tourte *et al.*, 2005; Hopkin, 2003; Madigan *et al.*, 2007). Synthétisée par la plante hôte, est localisée dans les cellules hôte infectées par les bactéroïdes. La leghémoglobine peut constituer jusqu'à 30% des protéines de la cellule hôte (Hopkin, 2003).

La synthèse de leghémoglobine dépend d'information génétique apportée par la plante et la bactérie, aucun des deux partenaires n'étant capable de la produire indépendamment de l'autre (Perry *et al.*, 2004). La globine étant codée par le génome de la plante, l'hème étant au contraire sous le contrôle du génome de la bactérie symbiotique (Madigan *et al.*, 2007). C'est elle qui donne la coloration rouge à la partie fixatrice d'azote. Cette couleur rouge est un critère de l'activité des nodules des légumineuses symbiotes (Tourte *et al.*, 2005)

On a donc longtemps pensé que la seule fonction de cette molécule était de piéger, avec une très forte affinité, toute trace d'oxygène qui aurait pu pénétrer dans le nodule, protégeant ainsi les nitrogénases de son effet toxique. En fait, elle assure également l'apport d'oxygène aux oxydases situées en fin de la chaîne d'oxydoréduction des bactéroïdes (Wajcman, 2002)



**Figure 2 :** Leghémoglobine de lupain: sa structure tridimensionnelle est très proche de celle de la myoglobine de vertébrés (Wajcman, 2002).

## **II- La symbiose**

### **b- Définition générale et historique**

D'un strict point de vue étymologique le mot symbiose provient du grec sym (avec) et biose (vie) d'où sa définition générale très large : vie avec ou vie en commun (Leffevre, 2004). La symbiose est une association de deux ou plusieurs organismes différents, qui leur permet de vivre avec des avantages pour chacun (Broughton, 2000).

Ce type de relation vitale a été observé pour la première fois en 1872 par Reinke (Perry, 2004). Le terme désignant des associations biologiques ne sera utilisé pour la première fois qu'en 1877 par Franck pour caractériser des lichens.

Le concept sera développé et explicité par le botaniste allemand De Bary en 1879 selon lequel la symbiose est l'association de deux organismes spécifiquement distincts, qui vivent ensemble (Leffevre, 2004).

### **c- Endo- et Ecto**

Selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo- ou ecto-symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ecto-symbiose ; sinon, on parle d'endosymbiose. L'endosymbiose peut être intra- ou extra-cellulaire (Broughton, 2000).

## **II-1- Symbiose *Trigonella*-bactérie**

### **II-1-1- Le partenaire végétale**

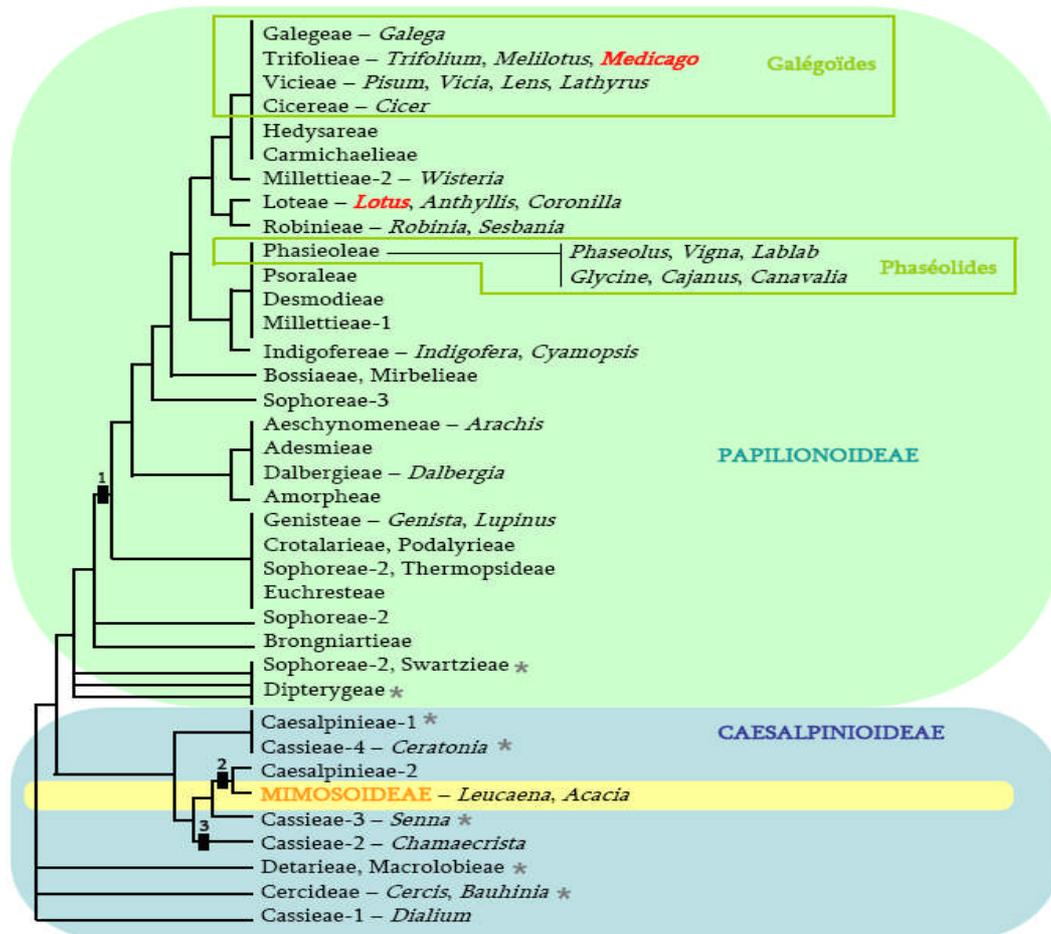
#### **a- Les légumineuses**

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est de produire des ayant un ovaire libre, constitué par seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois famille : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* (ou Fabacées) (Come *et al.*, 2006). Les Fabacées avec 10000 espèces représentent d'ailleurs la plus grande partie des légumineuses (Figure 4).

On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles. (Guignard *et al.*, 2004). Souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement (*Phasiolus*, *Physostigma*), soit grâce à des vrilles foliaires (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*).

Beaucoup d'espèces sont cultivées pour leurs graines qui sont riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines (Fenugrec, Lupin, Soja) les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotie servent à l'alimentation du bétail (Come *et al.*, 2006).

Les légumineuses entretiennent une relation très privilégiée avec la rhizosphère qui entoure leurs racines. D'après Tetu, « l'effet rhizosphérique des légumineuses est 20 à 30 fois supérieur à celui d'une betterave ou d'un colza ». On entend par effet rhizosphérique, le ratio entre la microflore rhizosphérique, à l'interface racine/sol (grosso modo, la terre qui reste collée aux racines lorsqu'on arrache une plante) et la microflore du sol située à distance des racines (Waligora *et al.*, 2008).



**Figure 4:** Classification phylogénique des Légumineuses

La superfamille des Légumineuses (ou Fabacées) se subdivise en trois familles, les Papilionoideae, et les Mimosoideae qui sont des familles phylogénétiquement très regroupées et les Caesalpinioideae, plus dispersées. Les groupes connus pour présenter des plantes non-nodulantes sont notés par un astérisque gris. Les deux groupes comprenant les principales légumineuses d'intérêt agronomique, les Galégoïdes et les Phaséolides, sont représentés par des encadrés. 1,2,3: Possibles origines indépendantes pour la nodulation (Doyle *et al.*, 1998)

## **b- La nodulation chez les légumineuses**

Toutes les espèces appartenant aux Légumineuses ne sont pas nodulées. Environ 20% des *Papilionoideae* (soit 3400 espèces) ont été testées pour leur aptitude à noduler. Le pourcentage des familles examinées capable de noduler se répartit de la façon suivante : *Papilionoideae* (97%), *Mimosoideae* (90%) et *Caesalpinoideae* (23%) (Duhoux *et al.*, 2004).

## **c- Intérêts scientifiques des légumineuses**

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin *et al.*, 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet *et al.*, 2006).

La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Pinochet *et al.*, 2006).

## **d- Intérêt agronomique des légumineuses**

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote) (Journet *et al.*, 2001). Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de *Rhizobium*. Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures (Baudoin *et al.*, 2001).

## **e- Intérêt alimentaire des légumineuses**

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des Légumineuses. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine

et animale (Journet *et al.*, 2001). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche) (Baudoin *et al.*, 2001).

### **II-1-1-1- *Trigonella***

Fenugrec (*Trigonella foenum graecum. L*) est une plante herbacée annuelle (Maletic et Jevdjovic, 2007) ou de vivaces (Burnie *et al.*, 2006) de la famille des Fabaceae. Apparenté au trèfle, ce genre réunit environ quatre-vingts espèces (Burnie *et al.*, 2006). Leur origine est la région méditerranéenne, et aujourd'hui il pousse dans le monde entier et particulièrement en l'Inde, l'Égypte, la Chine et l'Amérique (Burnie *et al.*, 2006).

Il est fréquemment utilisé dans la médecine vétérinaire et humaine (Maletic et Jevdjovic, 2007). Lors des études expérimentales et cliniques limitées, les graines de fenugrec ont révélé des propriétés anticholestérolémiantes et hypoglycémiantes; elles se sont également avérées efficaces pour stimuler l'appétit et la sécrétion d'insuline (Annonome, 2009).

La graine de fenugrec contient environ 26% de protéine, mucus 30%, 12% d'huile, 0,35% d'huile d'éther et beaucoup d'autres substances actives. La matière de protéine contient jusqu'à 55% des nucleo-protéides, 25% de globuline, 20% d'albumine considérant que la matière gras contient principalement des glycérides des acides gras insaturés (Maletic et Jevdjovic, 2007).

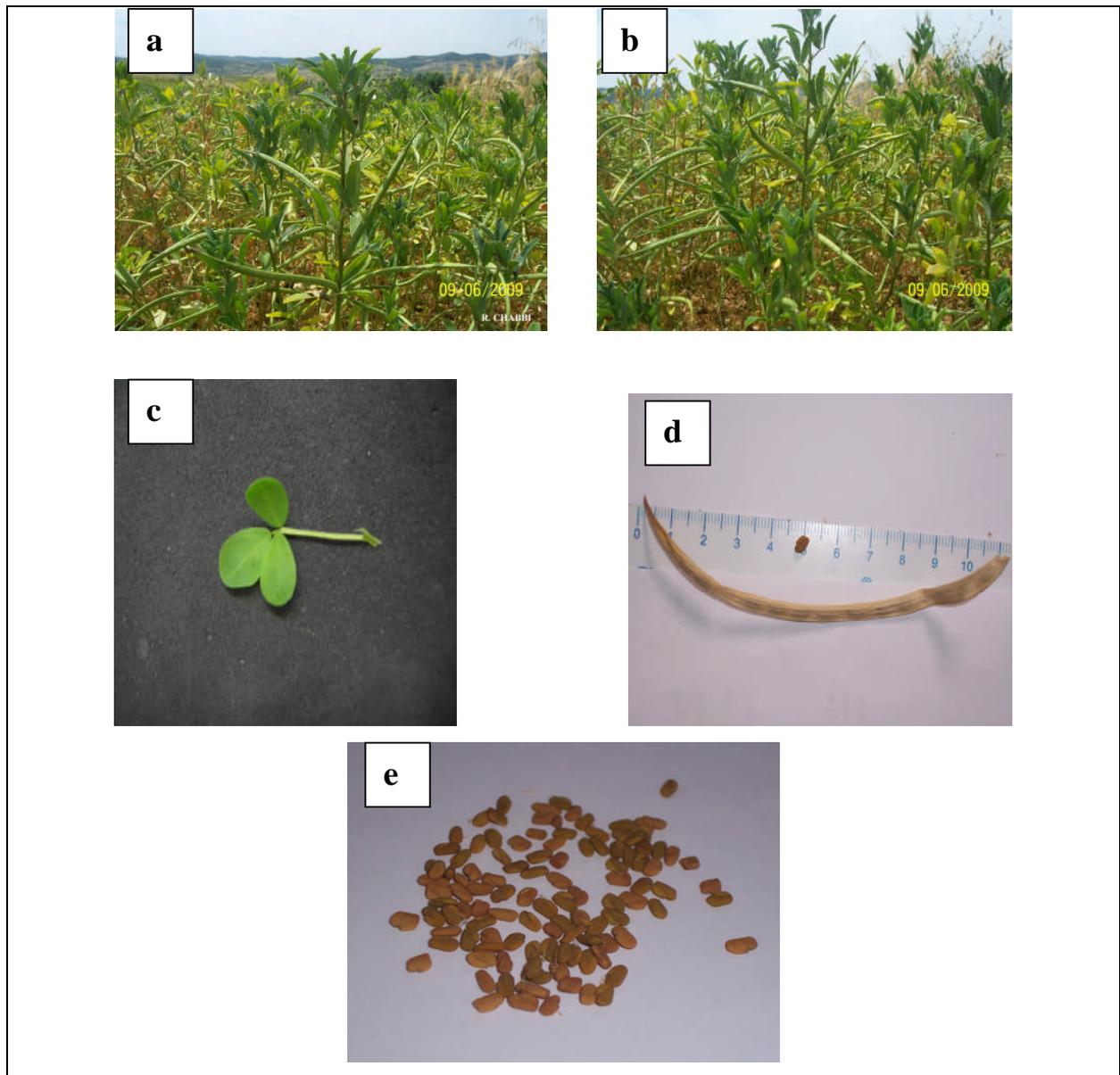
#### **b- Historique de la plante**

Les plantes du genre *Trigonella* et en particulier de l'espèce cultivée *T. foenum-graecum* (fenugrec) sont connus et utilisés à des fins différentes dans les temps anciens, notamment en Grèce et de l'Égypte (Rouk et Mangesha, 1963). En Afrique du Nord, elle a été cultivée autour de l'Oasis sahariennes depuis très longtemps (Duke, 1986).

Le Fenugrec a été introduit en Europe centrale au début du neuvième siècle (Schauenberg et Paris, 1990), selon Fazli et Hardman (1968) Charlemagne a encouragé la culture dans ce domaine. Rosengarten (1969) rapporte que les Romains ont obtenu la plante de la part des Grecs.

Au dix-septième siècle, les graines de fenugrec ont été recommandées pour aider à expulser le placenta de la femme après l'accouchement (Howard, 1987). L'herbe a été longtemps un favori des Arabes et il a été étudié à l'École de Salerno par les médecins arabes (Stuart, 1986). Fenugrec était connu et cultivée comme fourrage dans la Grèce antique. Théophraste lui a donné le nom grec (Voukeras) et (Tilis) et de l'huile produite à partir, il a été appelé (huile de Tilis).

Toutefois, il n'est pas mentionné dans aucun des herbes jusqu'à ce que la littérature du XVI<sup>e</sup> siècle, quand il a été enregistré comme grandi en Angleterre.



**Planche 1:** a ,b: pied de *Trigonella*, c : feuilles, d : gousse e : graines

## **b- Germination des graines**

Les graines du Fenugrec germent à environ 10 h après le début de l'imbibition de la graine à 25°C dans l'obscurité (Reid et Bewley, 1979; Spyropoulos et Reid, 1985)(Photographie e, Planche 1)

## **c-Développement de la graine**

Le Développement de la graine commence à la fécondation de l'ovule dans le sac embryonnaire, par l'un des pollen male du tube nucléique, et la fusion des deux noyaux polaires dans le sac embryonnaire avec l'autre tube pollinique. Le résultat est respectivement la formation de l'embryon et l'albumen. Le développement de la graine de fenugrec dure environ 120 jours après l'anthèse (Campbell et Reid, 1982). L'accumulation de Galactomannanes dans l'endosperme commence environ 30 jours après l'anthèse et se termine à environ 55 jours après l'anthèse, juste avant le poids frais de la semence commence baisse (Campbell et Reid, 1982).

## **d- Origine de la plante**

Sinskaya (1961) rapporte que les ancêtre sauvages direct du fenugrec cultivées appartiennent à l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. n'a pas été précisément déterminé, et l'existence de ces formes sauvages (qui n'ont pas échappé à la culture) ont posé des problèmes. De nombreux auteurs suggèrent que l'ancêtre direct des espèces cultivé est le fenugrec sauvage *T. gladiata* Ste qui diffère de *T. foenum-graecum* par l'ensemble de l'agrégat de caractères les plus marquants : dont la tuberculination des semences et la petite taille des gousses. Il est possible que l'espèce *T. foenum-graecum* évoluée de *T. gladiata*.

## **e- Distribution de la plante**

La région méditerranéenne est connue pour être l'habitat naturel du genre *Trigonella*. Les espèces sauvages du genre existent dans les pays d'Europe, la Macaronésie (îles Canaries) du Nord et l'Afrique du Sud, l'Asie centrale et de l'Australie (Anonyme, 1994). Fréquemment cultivée et souvent sub-spontanée en Algérie (Quezel et Santa, 1962).

## **f- Génétique de la plante**

La plante est auto-pollinisée, mais il existe des possibilités de croisement naturel. La variation inhérente au fenugrec est immense et il est cultivé aujourd'hui dans un large éventail

des conditions climatiques. Le Fenugrec en fonction de Darlington et Wylie (1945) a  $2n = 2x = 16$  chromosomes, tandis que Raghuvanshi et Joshi (1968) ont enquêté sur la présence de chromosomes B.

### **g- Morphologie de la plante**

#### **- Les Tiges**

Les tiges de fenugrec sont dressées, creuses, avec anthocyanine foncée ou vert complet. Les tiges en fonction de la variété, la fertilité des sols et de la densité du peuplement sont soit d'un seul ramification sans pousses secondaires, ou de plusieurs ramifications où se posent de nombreuses pousses de la base et plus les nœuds (Photographie a et b, Planche 1).

#### **- Les Fleurs**

L'épanouissement des fleurs de fenugrec, selon la variété, le climat et la saison des semailles commence environ 35-40 jours à partir de l'ensemencement. Elles sont assises dans l'aisselle des feuilles le plus souvent lié (deux a deux), plus rarement solitaires. Il existe deux types de fleurs :

1- Des fleurs Cleistogames (fermés). Dans cette catégorie appartiennent la majorité des fleurs de fenugrec, qui reste fermée pendant toute la durée de vie de la fleur, tandis que l'étandard et les ailes ouvertes quelques heures par jour (Petropoulos, 2002)

2- Des fleurs Aneictogames (ouverts). Ce sont des fleurs, dans lesquelles toutes les parties de la corolle reste ouvertes presque en permanence. Ces fleurs présentent généralement des anomalies, c'est la corolle qui est fusionnée sur le calice ou deux pistils etc, ils sont moins de un pour cent du nombre total des fleurs de fenugrec et sont en général nés à l'aveugle des pousses et offre de nombreuses possibilités pour la pollinisation croisée (Petropoulos,2002).

#### **- Les gousses**

Gousse allongée, glabrescente, longue de 7-10 cm, progressivement rétrécie en bec long de 3-5 cm (Quezel et Santa, 1962). (Photographie d, Planche 1)

## II-1-2- Le partenaire bactérien

### - **Rhizobium**

Les rhizobiums sont reconnus comme étant des bactéries fixatrices d'azote, Gram négatives, aérobies et présentes soit à l'état libre et en général dans le sol soit en association avec des légumineuses. Ils appartiennent à la sous classe alpha des protéobactéries de la grande classe des eubactéries (Maidak *et al.*, 1994).

### - **Taxonomie des rhizobiums**

La taxonomie a pour but de rassembler des organismes partageant des caractéristiques communes en groupes ou taxons bien délimités. Les groupes sont définis selon trois études, l'identification, la nomenclature et la classification. La première nécessite l'isolement de la bactérie, sa caractérisation par des analyses phénotypiques et moléculaires universelles et la comparaison des caractères à ceux des bactéries connues. La deuxième consiste à donner un nom spécifique à la bactérie identifiée selon le Code International de Nomenclature Bactérienne, qui comporte le nom du genre et de l'espèce. Tout genre doit être représenté par une espèce type et toute espèce doit être représentée par une souche type (Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia *et al.*, 2006)

Les rhizobiums ont été antérieurement définis comme des micro-organismes symbiotiques capables de former des nodosités au niveau du système racinaire des légumineuses. Frank (1879) a rapporté que ces micro-organismes étaient des champignons en leur affectant le nom de *Schinzia leguminosarum*. En 1888, Hellriegel et Willfarth ont fourni une explication scientifique pour la fixation biologique de l'azote. Dans la même année, Beijerinck (1888) a pu isoler une bactérie d'une plante légumineuse et l'a nommée *Bacillus radicola*. Par la suite, le bacille a été renommé *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Baldwin et Fred (1929) ont rapporté que la classification des différents rhizobiums devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte. Ainsi, Fred *et al.*, (1932) ont pu identifier six groupes de nodulation croisée, *Rhizobium leguminosarum* pour *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens* ; *R. trifolii* pour *Trifolium* ; *R. phaseoli* pour *Phaseolus* ; *R. meliloti* pour *Glycine max* et *R. lupini* pour *Lupinus*. Cette première classification a connu par la suite plusieurs critiques (Wilson, 1944).

Les observations discordantes entre la croissance de la bactérie et la gamme d'hôte ont jeté le doute sur la validité de cette classification. Toutefois, sur la base du taux de croissance, Jordan (1982) a pu classer les rhizobia en deux genres, le genre *Rhizobium* pour les souches à croissance rapide et le genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente.

Plusieurs méthodes comparatives comme la sérologie, SDS-PAGE des isoenzymes ou des protéines totales, FAME, le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN / ADN ou ADN / ADN, et l'analyse des plasmides ont été adoptées pour la classification des rhizobiums. Mais ce n'est qu'après l'identification en 1987 par Woese que les ADNr 16S des bactéries sont spécifiques à ces bactéries que la taxonomie des rhizobiums s'est considérablement modifiée. La première séquence partielle de l'ADNr 16S a été publiée par Young *et al.*, (1991) pour la souche *Rhizobium* BTAi1.

Graham *et al.*, (1991) ont rapporté que la description de toute nouvelle espèce doit se baser sur l'analyse génétique (Séquence de l'ADNr, homologie ADN / ADN) ainsi que sur l'analyse numérique. La combinaison de ces deux analyses a été ensuite reconnue sous le nom de l'approche polyphasique qui est retenue jusqu'à nos jours pour établir la taxonomie des rhizobiums.

De nos jours, l'usage de la séquence de l'ADNr 16S reste l'outil principal dans l'étude de la phylogénie microbienne. Cependant, de nouvelles techniques moléculaires sont récemment adoptées (El Hilali, 2006).

Au cours des vingt dernières années, la classification des rhizobia a subi de grands changements, notamment en raison de la découverte de nouvelles espèces BNL des plantes, principalement des régions tropicales et subtropicales (tableau 1). À partir d'un genre inclue quatre espèces en 1981, la classification aujourd'hui comprend au moins 13 genres comportant plus de 50 espèces, et le nombre continue d'augmenter (N'zoué *et al.*, 2006).

Zakhia *et al.*, (2004). A proposer le terme BNL (Bactéries Nodulantes des Légumineuses) pour éviter toute confusion entre le terme général de Rhizobium et le nom du genre. Actuellement, toutes les BNL décrites jusqu'ici appartiennent aux Proteobacteria et représentent au moins 9 groupes monophylétiques. La majorité d'entre eux appartiennent à des genres de la classe  $\alpha$ -Proteobacteria, nommés *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*. Récemment BNL ont été découvertes dans des genres de la classe  $\alpha$ -Proteobacteria, à savoir *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Ensifer*, *Ochrobactrum* et *Phyllobacterium* (N'Zoué *et al.*, 2006).

Les BNL ont été également découvertes dans la classe  $\beta$ -Proteobacteria, à savoir dans *Burkholderia* et *Ralstonia* (Moulin *et al.*, 2001). En outre, Benhizia *et al.*, (2004) a signalé l'association entre les légumineuses du genre *Hédysarum* et les souches appartenant à la classe  $\gamma$ -Proteobacteria, à savoir *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter Kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *vulneris coli* et *Pseudomonas sp* bien que leur capacité de nodulation n'est pas encore clairement démontrée.

**Tableau 1:** Classification des bactéries nodulants les légumineuses (N'zoué *et al.*, 2006).

Species	Host plants	References
<b>Class Alpha Proteobacteria</b>		
<b>Order Rhizobiales</b>		
<b>Family Rhizobiaceae</b>		
<b>Genus Rhizobium</b>		
<i>R. leguminosarum</i>		Jordan,1984; de Frank,1989
biovar viciae	<i>Pisum sativum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	//
biovar trifolii	<i>Trifolium pratense, Trifolium spp.</i>	//
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris L., P. angustifolius</i> <i>,P. multiflorus</i>	// //
<i>R. tropici</i>		
Type II A	<i>P. vulgaris L., Leucaena,</i> <i>Amorpha fruticosa</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> ,1991
Type II B	<i>P. vulgaris L., Leucaena</i>	
<i>R. elti</i> biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris,</i> <i>Leucaena</i>	Segovia <i>et al.</i> ,1993 ; Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 1995
<i>R. elti</i> biovar mimosae	<i>Mimosa affinis</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum,</i> <i>Desmodium gyroides,Desmodium</i> <i>triquetrum, Desmodiumheterophyllum,</i> <i>Acacia sinicus, Arachis</i> <i>hypogaea, Centrosema pubescens,</i> <i>Macroptilium lathyroides,</i> <i>Stylosanthes guianensis, Tephrosia</i> <i>candida, Uraria crinita, Zornia diphylla</i>	Chen <i>et al.</i> ,1997
<i>R. gallicum</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar gallicum	<i>Phaseolus vulgaris L.,</i> <i>Leucaenaleucocephala, Macroptilium</i> <i>atropurpureum,Onobrychis viciifolia</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris L</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica,</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	Van Berkam <i>et al.</i> , 1998
<i>R. galegae</i>		Lindström <i>et al.</i> , 1989
biovar orientalis	<i>Galega orientalis</i>	Radeva <i>et al.</i> , 2001
biovar officinalis	<i>Galega officinalis</i> <i>Astragalus cruciatus, Argyrolobium uniflorum,</i> <i>Anthyllis henoniana,</i> <i>Lotus creticus, Medicago spp.</i>	// Zakhia <i>et al.</i> , 2004
<i>R. giardinii</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar giardinii	<i>Phaseolus vulgaris L.,Leucaenaleucocephala,</i> <i>Macroptilium atropurpureum</i>	//
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	//
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera amblyantha, I. carlesii,</i> <i>I. potanini</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002

<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini <i>et al.</i> , 2002
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i>	Wei <i>et al.</i> , 2003
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla varia</i> , <i>Amphicarpaea trisperma</i> , <i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	Tan <i>et al.</i>

**Genus *Sinorhizobium***

<i>S. meliloti</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ; Chen <i>et al.</i> , 1988 <i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , Jordan, 1984 ;de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ; Dangeard, 1926 <i>Trigonella</i>	
biovar <i>acaciae</i>		Ba <i>et al.</i> , 2002
<i>S. fredii</i> 1984		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ; Scholla <i>et al.</i> ,
chemovar <i>fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla <i>et al.</i> , 1984
chemovar <i>siensis</i>	<i>Glycine max</i>	//
<i>S. sahelense</i>	<i>Sesbania</i> spp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i> spp.	Boivin <i>et al.</i> , 1999
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania</i> spp.	//
<i>S. terangaie</i>		deLajudie <i>et al.</i> , 1994 ; Trüper <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i> spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania</i> spp.	//
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.	Rome <i>et al.</i> , 1996
<i>S. kostiense</i> 1999	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> ,
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>S. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Toledo <i>et al.</i> , 2003
<i>S. arbores</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 2003
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Squartini <i>et al.</i> , 2002
<i>Ensifer adhaerens</i> <i>Sesbania</i> , ( <i>Sinorhizobium adhaerens</i> )	<i>Medicago</i> <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Leucaena, leucocephala</i> , <i>Pithecellobium dulce</i> , <i>Medicago sativa</i>	Casida, 1982 Willems <i>et al.</i> , 2003

**Genus *Allorhizobium***

<i>A. undicola</i> 1998	<i>Neptunia natans</i> ,	deLajudie <i>et al.</i> , 1998 deLajudie <i>et al.</i> ,
	<i>Acacia senegal</i> , <i>A. seyal</i> , <i>A. tortilis</i> , <i>Lotus arabicus</i> , <i>Faidherbia albida</i>	

**Family *Phyllobacteriaceae***

**Genus *Mesorhizobium***

<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>L. japonicum</i> , <i>L. krylovii</i> , , <i>L. filicalius</i> , <i>L. schoelleri</i> , <i>Anthyllis</i> spp., <i>Lupinus</i> spp.	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i> spp.	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> ,	Chen <i>et al.</i> , 1995

	<i>G. uralensis</i> ,	
	<i>Sophora alopecuroides</i> , <i>Glycine max</i> ,	
	<i>Swainsonia salsula</i> , <i>Halimodendro</i>	
	<i>holodendron</i> , <i>Caragana polourensis</i>	
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia senegal</i> ,	deLajudie <i>et al.</i> , 1998
	<i>A. seyal</i> , <i>A. tortilis</i> ,	
	<i>Leucaena leucocephala</i> , <i>L. diversifolia</i> ,	
	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Chamaecrista ensiformis</i>	
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velazquez <i>et al.</i> , 2001
<b>Genus <i>Phyllobacterium</i></b>		
<i>Phyllobacterium</i> sp.		Valverde <i>et al.</i> , 2004
<b>Family <i>Methylobacteriaceae</i></b>		
<b>Genus <i>Methylobacterium</i></b>		
	<i>Crotalaria podocarpa</i> ,	Jourand <i>et al.</i> , 2004 ;
	<i>C. Perottetti</i>	Sy <i>et al.</i> , 2001
<i>M. nodulans</i>	<i>C. glaucooides</i> .	
<b>Family <i>Brucellaceae</i></b>		
<b>Genus <i>Ochrobactrum</i></b>		
	<i>A. mangium</i> ,	Ngom <i>et al.</i> , 2004
	<i>Faidherbia albida</i> ,	
	<i>Paraserianthes falcataria</i>	
<b>Family</b>		
<b>Hyphomicrobiaceae</b>		
	<i>Neptunia natans</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2002 ;
2003		
<b>Genus <i>Devosia</i></b>		
<i>"Devosia neptuniae"</i>		
<b>Genus <i>Azorhizobium</i></b>		
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>A. johannense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	//
<i>Azorhizobium</i> sp.	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
		Jordan, 1982
<b>Family <i>Bradyrhizobiaceae</i></b>		
<b>Genus <i>Bradyrhizobium</i></b>		
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> ,	Jordan, 1984 ; Kirchner, 1896
	<i>Glycine soja</i> ,	
	, <i>Macroptilium atropurpureum</i>	
	<i>B. elkanii</i> <i>Glycine max</i> , <i>Vigna spp.</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>Macroptilium atropurpureu</i>	
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza cuneata</i> .	Yao <i>et al.</i> , 2002
<i>B. betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2004
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteeae &amp; Loteae</i> plants	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Mimosa</i>	Jordan, 1982
	<i>Faidherbia</i> , <i>Acacia</i> ,	
	27 herb legumes	Willems <i>et al.</i> , 2001;
		Dupuy <i>et al.</i> , 1994 ;
		Alazard <i>et al.</i> , 1985 ;

	<i>Aeschynomene</i>	Alazard <i>et al.</i> , 1985 ; Young <i>et al.</i> , 1991
<b>Genus <i>Blastobacter</i></b>		
<i>B. denitrifican</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 2002

---

**Class Beta Proteobacteria**

**Order *Burkholderiales***

**Family *Burkholderiaceae***

**Genus *Burkholderia***

<i>B. caribensis</i>	<i>Mimosa pudica</i> , <i>M. diplotricha</i> .	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>B. cepacia</i> genomovar VI ( <i>B. dolosa</i> )	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	Vermis <i>et al.</i> , 2004
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002

**Genus *Ralstonia***

<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa pudica</i> , <i>M. diplotricha</i> .	Chen <i>et al.</i> , 2001
-----------------------	---	---------------------------

---

**Class Gamma-Proteobacteria**

**Order *Enterobacteriales***

<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Hedysarum carnosum</i> , <i>H. spinosissimum</i> subsp. <i>capitatum</i> , <i>H. pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004
<i>Enterobacter kobei</i>	<i>Hedysarum carnosum</i> , <i>H. spinosissimum</i> subsp. <i>capitatum</i> , <i>H. pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Hedysarum carnosum</i> , <i>H. spinosissimum</i> subsp. <i>capitatum</i> , <i>H. pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Hedysarum carnosum</i> , <i>H. spinosissimum</i> subsp. <i>capitatum</i> , <i>H. pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Hedysarum carnosum</i> , <i>H. spinosissimum</i> subsp. <i>capitatum</i> , <i>H. pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004
<b>Order <i>Pseudomonadales</i></b>		
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Hedysarum carnosum</i> , <i>H. spinosissimum</i> subsp. <i>Capitatum</i> <i>H. pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004

### **III- La nodulation**

#### **III-1- Ontogenèse d'un nodule**

Les conditions requises avant la mise en place de la symbiose sont : une faible teneur en azote du sol et une photosynthèse active pour assurer une source suffisante d'énergie (Kondorosi et Kondorosi, 2000).

Le développement du nodule est un processus complexe impliquant la différenciation de plusieurs types de cellules spécialisées comme résultat d'une série d'échanges de signaux entre la plante et les partenaires microbiens (Brewin *et al.*, 1992). L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan *et al.*, 2007). Les étapes sont :

##### **III-1-1- Préinfection**

L'étape préliminaire de l'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la plante permettant la croissance des bactéries de manière sélective (Savka *et al.*, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape *et al.*, 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado *et al.*, 1995). Les germes sont attirés par des produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes exsudés par les racines. L'interaction est spécifique : une souche bactérienne n'attaque pas n'importe quelle plante, et inversement la plante ne se laisse pas envahir par n'importe quelle souche. L'invasion et la formation des nodules est le résultat d'un échange de signaux chimiques selon un programme qui doit décider si la symbiose doit être menée à son terme ou non (Pelmont, 1995).

##### **III-1-2- Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces**

Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes *nod* chez les rhizobia. Le rhizobium, qui vit libre dans le sol, est doté sur son enveloppe externe des récepteurs spécifiques aux différents composants de l'exsudat racinaire (Waligora *et al.*, 2008)

Le produit du gène *nodD*, synthétisé de façon constitutive est impliqué dans la reconnaissance de ce signal et dans l'activation de la transcription des autres gènes *Nod*. La transcription des autres gènes *nod* a pour effet la synthèse des facteurs Nod qui sont les molécules bactériennes reconnues à leur tour par la plante (Miklashevichs *et al.*, 2001).

Les types de facteurs Nod produits ainsi que leur quantité permettent une reconnaissance spécifique de chaque rhizobia par son partenaire végétal. Leur structure amphiphile permet une intégration rapide dans les membranes. Cependant, ils seraient incapables de traverser la membrane végétale, un récepteur membranaire serait donc nécessaire pour permettre leur détection par la plante (Cullimore *et al.*, 2001).

### **III-1-3- Attachement :**

Une protéine d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, est présente à la surface des cellules des espèces de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. La rhicadhésine est une protéine affine pour le calcium (Brewin *et al.*, 1992 ; Madigan *et al.*, 2007) et elle opère en se fixant sur des complexes calcique à la surface des poils absorbants générant ainsi une oscillation en ions  $\text{Ca}^{2+}$ . D'autres substances comme les lectines, qui sont des glycoprotéines végétales, ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Madigan *et al.*, 2007).

D'autres facteurs physico-chimiques pourraient également jouer un rôle dans l'attachement (Hopkin, 2003).

### **III-1-4- Recourbement des poils absorbants et formation du cordon d'infection**

Même sans attachement bactérien, la molécule de signalisation lipooligosaccharide dérivée des rhizobiums infectants est suffisante pour causer le recourbement des poils absorbants (Brewin, 1992).

Lors de ce stade de la nodulation, la bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemma (Hopkin, 2003). L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine. Dès la reconnaissance du *Rhizobium* spécifique, des modifications structurales apparaissent dans les toutes premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologique du poil absorbant : dépolarisations membranaires, modification de concentrations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, augmentation de pH et fragmentation de l'actine (Duhoux *et al.*, 2004).

L'activation des cellules du cortex interne conduit à des divisions, anticlines puis périclines, et à l'édification progressive d'un méristème « nodulaire » qui sera à l'origine du futur nodule (Duhoux *et al.*, 2004).

Certains des poils absorbants infectés se courbent et forment une « crosse de berger » à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient. C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhoux *et al.*, 2004). Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les rhizobiums dans les cellules du méristème nodulaire.

### **III-1-5- Développement du nodule et libération des bactéries**

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkin *et al.*, 2003). Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte (Raven *et al.*, 2007). Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote, nommées bactéroïdes (Hopkin *et al.*, 2003 ; Raven *et al.*, 2007).

Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane, nommée membrane pér bactéroïdienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses modifications métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale : la fixation d'azote (Hopkin *et al.*, 2003).

L'endocytose est probablement la conséquence d'interactions physiques entre lipopolysaccharides sur la surface des bactéries et des composés glycoprotéiques et glycolipidiques sur la surface de la membrane cellulaire de la plante (Brewin *et al.*, 1992).

La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et des cellules corticales de la racine produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosité (Davet, 1996 ; Raven *et al.*, 2007).

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

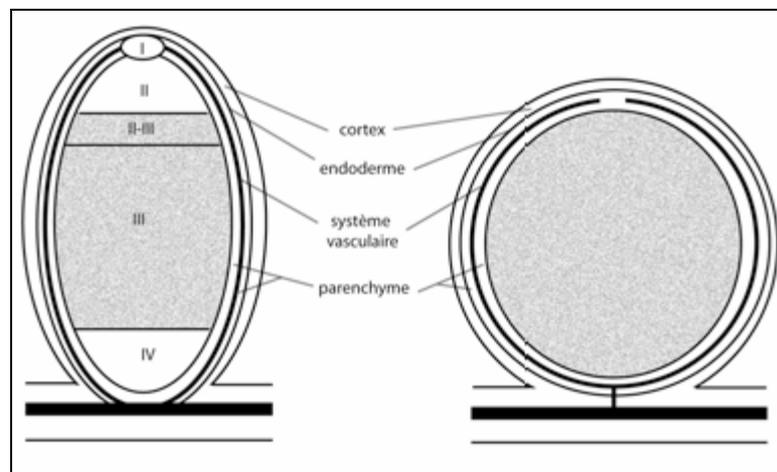
### **III-2- Différenciation des zones d'un nodule**

L'infection par les cordons d'infection a lieu à partir de la base du nodule, ce qui établit un gradient de différenciation et plusieurs zones ont pu être définies (Vasse *et al.*, 1990) ; (Figure 5)

- La zone I ou zone méristématique correspond à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries.

- La zone II ou zone de préfixation contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroïdienne (MPB) et leur différenciation en bactéroïde commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.
- Dans l'interzone II-III, la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplastes.
- La zone III ou zone de fixation est celle où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- Dans des nodules âgés, la zone IV correspond à une zone de sénescence.

Chez les espèces à nodules déterminés, le même gradient de différenciation peut être observé dans le temps, au cours du développement du nodule (Pawlowski et Bisseling, 1996).



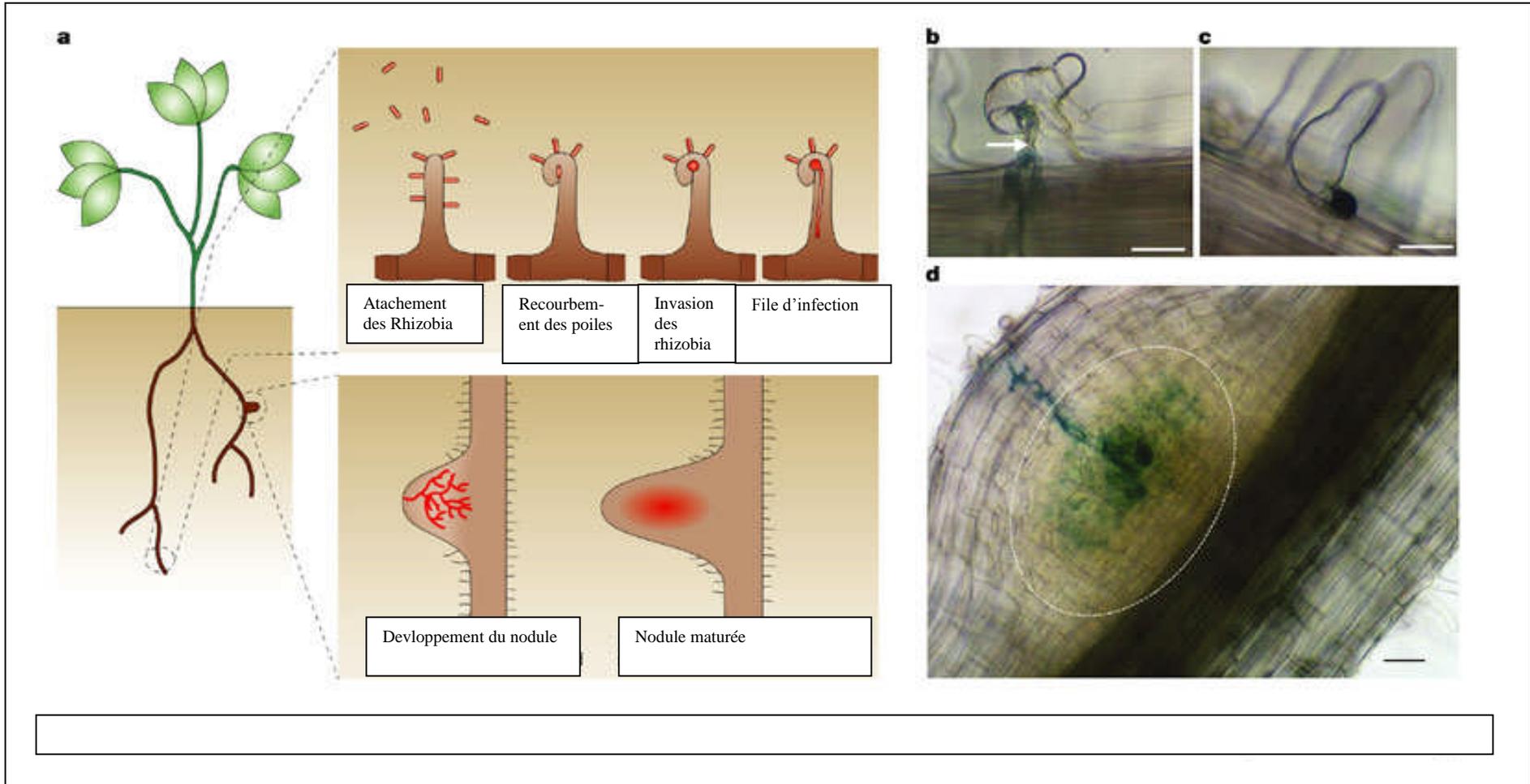
**-A-**

**-B-**

**Figure 5:** Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. **A** : Nodule de Légumineuse de type indéterminé. **B**: Nodule de Légumineuse de type déterminé. I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone II-III ; IV : zone de sénescence. ( Pawlowski et Bisseling, 1996).

### III-3- Formes des nodules

Le nodule achevé peut prendre deux formes : soit cylindrique, avec un méristème apical, une croissance indéterminée et un système conducteur ramifié (*Vicia*, *Trifolium*), soit sphérique, avec une croissance définie et des éléments conducteurs en forme d'arc, ayant un débouché commun dans le système conducteur de la racine (*Phaseolus*, *Glycine*) (Richter, 1993).



**Figure 6:** Processus de la nodulation (Giles *et al.*, 2004)

## **IV- Génétique de la symbiose et de la nodulation**

L'établissement de la symbiose légumineuse-rhizobium est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, entre la bactérie et son hôte.

### **IV-1- Les flavonoïdes et la diversité des facteurs Nod**

#### **IV-1-1- Les flavonoïdes**

La nécessité de flavonoïdes inducteurs a été démontrée dès 1986 dans le cas de l'interaction Luzerne/*Rhizobium meliloti* (Macheix *et al.*, 2005).

Les graines en germination et la partie apicale des racines excrètent des flavonoïdes qui, à des concentrations nanomolaire, stimulent de façon sélective les *Rhizobium* présents dans l'environnement (Davet, 1996).

Actuellement, de nombreuses espèces de flavonoïdes ont été caractérisées dans les exsudats racinaires, beaucoup d'entre elles stimulent la nodulation mais certaines espèces inhibent en fait le processus (Hopkins, 2003).

L'interaction symbiotique déclenché sous la responsabilité des flavonoïdes qui libéré par les racines des légumineuses et réorganisé par les facteurs Nod des rhizobia (Boukli, 2006). Différents composés phénoliques sont inducteurs des gènes *nod*, mais avec des efficacités variable selon leur concentration et leur structure chimique, en particulier le degré d'hydroxylation des molécules et l'espèce de *Rhizobium*. Ce sont généralement des flavonoïdes dont le chrysoériol et la lutéoline chez la luzerne, l'apigénine et l'ériodictyol chez le pois ou des isoflavonoïdes comme la daidzéine du soja ou la formononétine-7-O-(6''-O-malonylglucoside) des exsudats racinaires de la Luzerne (Macheix *et al.*, 2005)

La nature et la concentration des composés phénoliques inducteurs peuvent varier avec la nature de la plante, son stade de développement et les conditions de l'environnement, ce qui peut conduire à modifier fortement les capacités de nodulation (Macheix *et al.*, 2005).

Ces signaux ont un effet chimiotactique et, d'autre part, activent la transcription d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes *nod*) (Davet, 1996).

#### **IV-1-2- Les facteurs Nod**

Après avoir colonisé la rhizosphère, les rhizobiums commencent à synthétiser des signaux moléculaires morphogènes appelés facteur de nodulation, ou facteurs Nod (Hopkins, 2003).

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation (Terefework, 2002).

Les facteurs Nod sont des dérivés de la chitine, un polymère de N-acetyl-D-glucosamine avec des liaisons  $\beta$ -1-4. Les facteurs Nod sont des polymères similaires sauf un acide gras remplace un groupement acétyle à l'une des extrémités de la molécule (Hopkins, 2003). Par conséquent les facteurs Nod sont des lipo-chitino-oligosaccharides (Terefework, 2002 ; Hopkins, 2003).

La nature de l'acide gras (longueur et degré d'insaturation) et des substituants chimiques présents sur le squelette d'oligo-chitine sont caractéristiques d'une espèce bactérienne donnée et déterminent la spécificité d'interaction entre la bactérie et sa plante hôte (Debellé *et al.*, 2007).

Au cours de ces dix dernières années, les recherches entreprises sur des légumineuses modèles telles que *Lotus japonicus* ou *Medicago truncatula* ont permis : (1) de mettre en évidence une voie de signalisation Nod et d'identifier les gènes qui la contrôlent ; (2) de montrer l'intervention de l'ion calcium à différents niveaux de cette voie (Debellé *et al.*, 2007).

Une souche donnée de *Rhizobium* n'établit des symbioses qu'avec un nombre restreint d'espèces végétales. Une des bases de cette spécificité d'hôte est la diversité des facteurs Nod. En effet, la structure des facteurs Nod, qui a été déterminée initialement par Lerouge *et al.*, en 1990, varie d'une souche de *Rhizobium* à l'autre. Par exemple, les facteurs Nod produits par *R. meliloti* sont modifiés par un groupement sulfate qui est incorporé par la sulfotransférase bactérienne NodH. Ce groupement sulfate est absolument nécessaire à la reconnaissance par la Luzerne, qui est l'hôte naturel de *R. meliloti*. En effet, en absence du groupement sulfate, les facteurs Nod de *R. meliloti* sont inactifs sur la Luzerne, alors que, de façon étonnante, ils deviennent partiellement actifs sur des plantes normalement non hôtes telles que la vesce (Barbier-Brygoo, 1996).

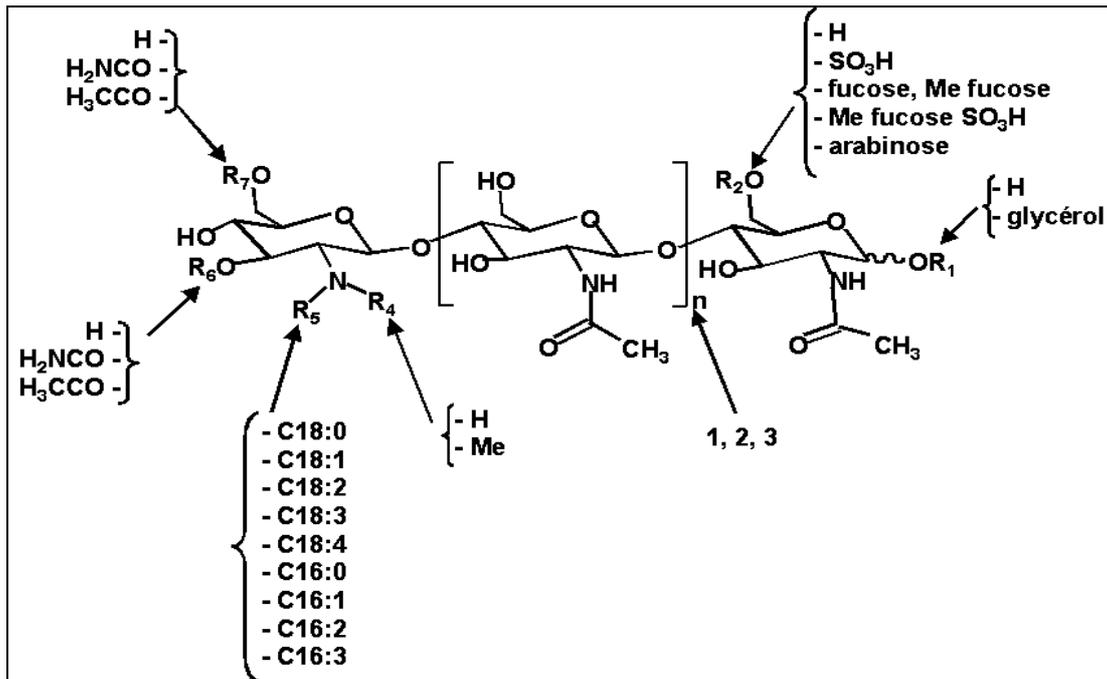


Figure7 : Schéma structural d'un facteur Nod (Barbier-Brygoo,1996)

#### IV-2- Les gènes de nodulation

L'analyse génétique de diverses espèces de *Rhizobium* a permis d'identifier des gènes *nod* qui contrôlent la spécificité de l'hôte, l'infection et la formation des nodosités. Ces gènes *nod* sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les partenaires symbiotiques (Dénarié, 2000).

La capacité des rhizobia à former des nodules repose sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*) indispensables à la symbiose. Les gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod), qui agissent comme molécules signal et induisent la formation des nodules (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

Les gènes *nod* sont activés par les flavonoïdes des exsudats racinaires émis par l'hôte. Les gènes *nod* sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire (ou plasmide) du rhizobium appelé plasmide Sym (pour symbiose) (Hopkins, 2003 ; Dupux, 2005 ; Madigan *et al.*, 2007).

##### IV-2-1- Les gènes *nod* communs

Les gènes communs *nodA*, *nodB* et *nodC* sont des gènes clés de la nodulation car ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod (Boivin-Masson *et al.*, 2006). Sont des gènes dits communs car, rencontrés chez toutes les espèces de *Rhizobium*

(Werner, 1992 ; Dénarié, 2000 ; Duhoux, 2004) et sont réunis en un même opéron (Davet, 1996).

Ainsi, hormis les gènes *nodA*, *nodB*, *nodC* fonctionnellement interchangeables entre toutes les espèces de *Rhizobium* (Madigan *et al.*, 2007) et nécessaires notamment pour induire le recourbement des poils absorbant et inciter la division des cellules corticales (Werner, 1992 ; Pelmont, 1995).

Un grand nombre de séquences, complètes ou partielles, des gènes *nodABC* sont aujourd'hui disponibles dans les banques de données : plus d'une centaine de séquences complètes pour *nodA*, de l'ordre d'une vingtaine pour *nodB* et *nodC*. Les séquences nucléotidiques des différents variants de *nodA*, *nodB* ou *nodC* présentent entre elles environ 40 % à 100 % d'identité (Boivin-Masson *et al.*, 2006 ; Bontemps *et al.*, 2005). Dans la mesure où ces gènes n'ont pas de paralogues chez les non rhizobia, ils constituent la signature moléculaire d'un rhizobium (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

#### **IV-2-2- Les gènes de spécificité d'hôte**

Un grand nombre des gènes *nod* déterminent la spécificité d'hôte dites : gènes *hsn* (host specificity of nodulation) (Werner, 1992). Ces gènes nommés aussi gènes *nod* EFGH (Hopkins, 2003). Sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (Pelmont, 1995), présents chez certaines espèces et non chez d'autres.

Ces gènes déterminent la nature des groupements greffés sur la structure tétramérique de base. Ils sont, de se fait, responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996). Parmi les gènes de spécificité d'hôte, impliqués dans la synthèse des facteurs Nod, on peut citer : les gènes *nodZ* et *noIK* (fucosylation) ; *noeC* (arabinosylation) ; *nodH* et *noeE* (sulfatation) ; *nodL*, *nodX* et *noIL* (acétylation) ; *nodS* et *noel* (méthylation) ; *nodU* et *noIO* (carbamoxylation) (Sebbane, 2007).

#### **IV-2-3- Les gènes *nodD***

Gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoïdes (Pelmont, 1995). Chez *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, le gène *nodD* code une protéine régulatrice, NodD, qui acquiert des propriétés d'activateur transcriptionnel et contrôle ainsi la transcription des autres gènes *nod* (Madigan, 2007; Werner, 1992)

### **IV-3- Aspects moléculaires de la fixation d'azote**

Plusieurs groupes de gènes et du microsymbionte et des racines de la plante hôte, contribuent à la fixation biologique de l'azote (Hopkins, 2003).

#### **IV-3-1- Les gènes *nif***

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse d'un complexe enzymatique (nitrogénase) responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac (Dénarié, 2008).

La nitrogénase est une protéine très conservée, et les gènes *nifHDK* qui codent ses composants sont présents chez tous les fixateurs d'azote examinés à ce jour. Les nitrogénase alternatives sont codées par leurs propres gènes, *vnfHDK* pour le système au vanadium, et *anfHDK* pour le système au fer, qui présentent une homologie de séquence significative avec *nifHDK* (Madigan *et al.*, 2007). Deux gènes *nif*, *nifD* et *nifK*, par exemple, codent respectivement pour les deux sous-unités de la protéine MoFe. La protéine Fe et la ferrédoxine sont codées respectivement par les gènes *nifH* et *nifF*. D'autres gènes *nif* sont impliqués dans l'insertion du cofacteur de la protéine MoFe ainsi que dans l'activation et l'assemblage du complexe enzymatique (Hopkins, 2003 ; Pelmont, 1995).

#### **IV-3-2- Les gènes *fix***

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotique et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Brewin, 1992 ; Hopkins, 2003). Les gènes *fixNOQP* codent pour une cytochrome oxydase, *fixGHIS* code pour la pompe cationiques *fixABCX* code pour une flavoprotein, qui sont tous nécessaires pour la fixation de l'azote. Dans l'environnement des nodules racinaire, cette oxydase offre l'énergie nécessaire, alors que la flavoprotein dirige le flux d'électrons à l'oxydase (Crossman, 2004).

### **IV-4- Rôle symbiotique des polysaccharides de surface**

#### **IV-4-1- Les exopolysaccharides (EPS)**

Ce sont les plus étudiés de tous les polysaccharides de surface. Un intérêt particulier à été porté aux succinoglycanes présents à la fois chez *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium*.

L'absence des exopolysaccharides bactériens provoque chez la plante la production excessive de composés phénoliques qui colorent en brun les racines et provoquent une

apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries. De plus, le cordon d'infection ne progresse pas et des aberrations (poches) apparaissent. Ainsi leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote se situe dans l'inhibition des réactions de défenses des plantes et dans la progression du cordon d'infection (Chataigné, 2007).

#### **IV-4-2- Les polysaccharides capsulaires (KPS)**

Au contact de la surface de la bactérie se trouvent les polysaccharides capsulaires. Ceux de la famille des *Rhizobia* sont composés de sucres appartenant à la famille de l'acide 2-céto-3-désoxy-ulosonique (Kdo), notés Kdx. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est inconnu à ce jour. Peu d'études ont été réalisées pour comprendre leurs modes d'action. Ils pourraient avoir un simple rôle passif de protection lors des changements brusques d'environnement (passage du sol à la plante) et faces aux défenses de la plante (antibiotiques de nature peptidique) et au choc alcalin (Chataigné, 2007).

#### **IV-4-3- Les lipopolysaccharides (LPS)**

Beaucoup de structures de LPS de *Rhizobia* sont partiellement décrites mais relativement peu sont complètes à ce jour.

Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote réside dans l'inhibition des réactions de défenses de la plante dans les étapes plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisés, en empêchant la mise en place du choc oxydant. Ils ont par ailleurs un rôle dans la pénétration des bactéries dans les cellules nodulaires, lorsqu'elles sont libérées du cordon d'infection. Les composés sont aussi des agents de cohésion membranaire. Pour cette raison, les LPS semblent nécessaires à la survie de la bactérie lors de sa transformation en bactéroïde (changement de forme et de taille) (Chataigné, 2007).



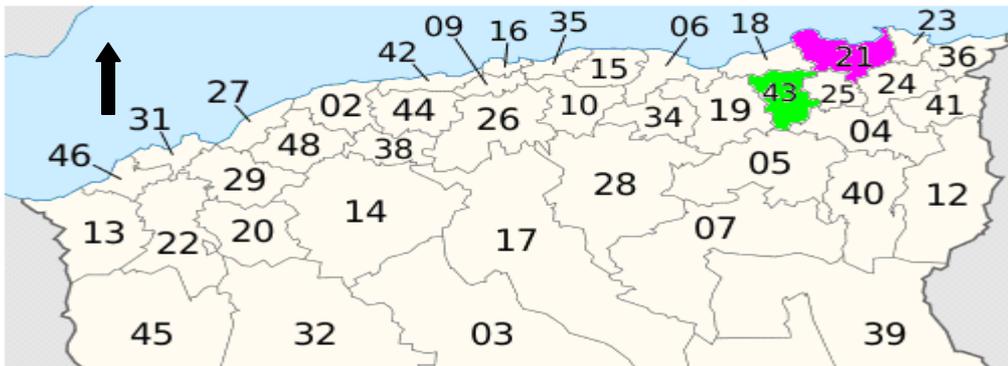
# Chapitre II

## Materiel et Méthodes

## I- Isolement des bacteries nodulant le fenugrec (*Trigonella*)

Les nodules ont été obtenus à partir du genre végétal *Trigonella* L qui été cultivé dans trois régions de l'Est algérien différentes sur les conditions climatique et pédologique.

Deux échantillons collecté à partir de la région de Bin El Ouidenne (latitude 36°48' 15''N et longitude 6°34' 2E) et Mohamed Fakhet (latitude 36°50' 32.28''N et longitude 6°40'35''E) commune de Tamalousse wilaya de Skikda (**21**). Le troisième échantillon cultivé dans la région Amira Arrese wilaya de Mila (**43**) (latitude 36°27'N et longitude 6° 15' 52''E).



**Carte 1** : Localisation géographique des zones de prélèvement

### I-1- Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réaliser durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectué au printemps durant le mois de Mars et Avril quant la terre est sec, à cette période de l'année les nodules sont bien développée et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck *et al.* , (1993). Une creusée d'environ 15cm au tour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire ; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ; couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachées à 1à2mm du site d'attache, en fin séchées avec du papier filtre avant leur conservation.

## I-2- Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. 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  $\text{CaCl}_2$  (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules (figure 9).

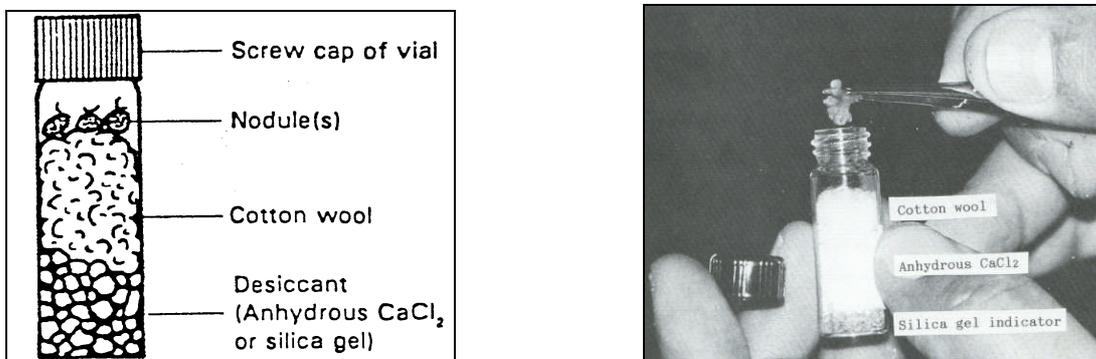


Figure 9 : Conservation des nodules sous  $\text{CaCl}_2$  (Vincent, 1970).

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

La technique d'isolement des bactéries est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1985, 1994).

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles qui sont conservées par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis pendant 1h à la température ambiante.

### I-3-1- Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans le Chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g  $\text{HgCl}_2$  + 5ml  $\text{HCl}$  + 1L d'eau distillée) pendant 3 minutes. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10<sup>ème</sup> rinçage.

### I-3-2- Ecrasement des nodules

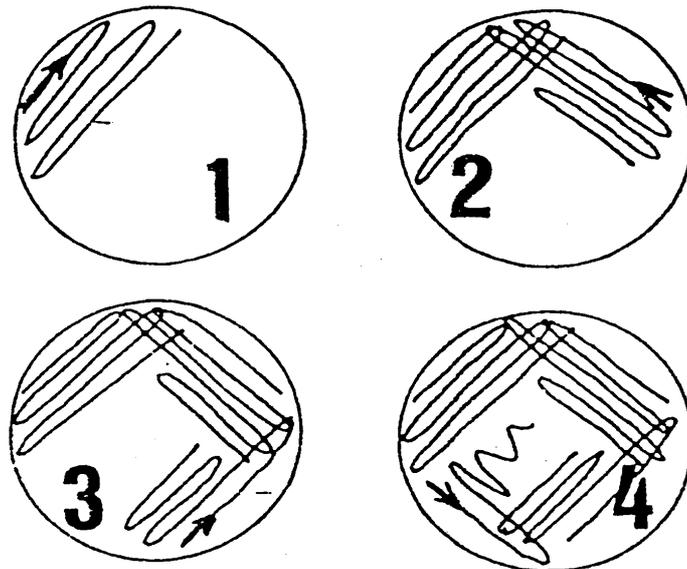
Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile .puis déposées chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.

### I-3-3- Isolement des souches

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970). (Figure 10) sur gélose coulé en boîte (YMA+RC et GPA), puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures.

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

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



**Figure 10:** 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)
  - YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Blue)
  - GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.

- Milieu YMA+ Calcofluor : (Struffi, 1998)

A fin d'évaluer la capacité des isolats à produire les Exopolysaccharides (EPS) on va ensemences sur des boites contenant un milieu YMA additionné de 0.02% de Calcofluor.

- Incubées les boites à 28°C pendant 24heures.
- Exposer les boites aux rayons d'une lampe UV d'une irradiation 270 nm et noté les résultats.

## **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 les placer dans un bain-marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique sont enfin réalisés.

## **II-3- Examens microscopiques :**

### **a- 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 les classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram - (**Annexe 2**).

#### **b- Examen de la mobilité :**

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

#### **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 dans un bain-marie avec agitation à une température de 30°C.

Le choix d'un procédé assurant la parfaite stabilité des microorganismes et leur survie prolongée dépend :

- de la nature de microorganisme à conserver.
- des besoins du laboratoire et de ses moyens.

Il existe plusieurs techniques de conservation. Dans notre travail, deux méthodes sont utilisées :

La première est la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO<sub>3</sub> comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des culture bactérienne en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 30°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent ,1970).

La deuxième méthode est la conservation sur YMA additionné 30% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes d'Eppendorf en un temps de 24 à 48h d'incubation à 30°C , puis mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à -20°C.

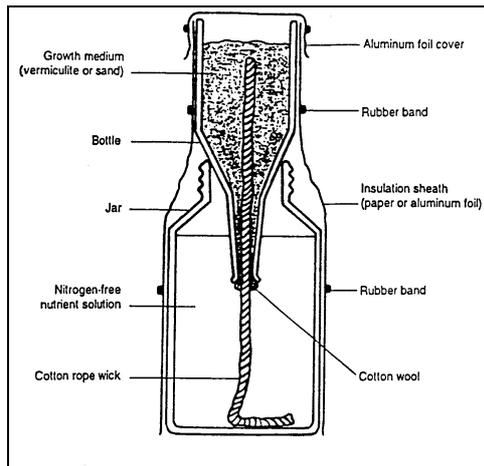
**Tableau 2 : les souches utilisées dans cette étude**

<b>Code de la souche</b>	<b>Nom de la souche</b>	<b>Plante hôte</b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Source</b>
<b>TB1</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TB4</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TB7</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TB10</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TF1</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TF2</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TF5</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Skikda Algérie	Notre étude
<b>TM6</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Mila Algérie	Notre étude
<b>TM7</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Mila Algérie	Notre étude
<b>TM8</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Mila Algérie	Notre étude
<b>TM11</b>	Isolat	<i>Trigonella</i>	Mila Algérie	Notre étude
<b>HS1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.NZ096	<i>H. capitatum</i>	Constantine Algérie	Y.Benhizia-Cne
<b>A6</b>	<i>Rhizobium sulla</i> sp.nov. RHA6	<i>H. coronarium</i>	Constantine Algérie	A.Benguedouar-Cne
<b>Hca1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. KD	<i>H. carnosum</i>	Biskra Algérie	Y.Benhizia-Cne
<b>HP7</b>	<i>Enterobacter kobei</i>	<i>H. pallidum</i>	Setif Algérie	Y.Benhizia-Cne
<b>HnA</b>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>H. naudinianum</i>	Setif Algérie	A.Toreche-Cne

## II-5- Authentification des isolats

### II-5-1- Test de nodulation

Le but de ce test est d'identifier les souches et évaluer leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970 ; Beck *et al.*, 1993). Ce test consiste en l'inoculation des graines germées de la plante hôte (*Trigonella L*) avec les différents isolats obtenus. Il est réalisé dans des jarres de Léonard (Vincent, 1970). (Figure 11 et Photographie 1).



**Figure 11 :** Jarre de Léonard (Vincent, 1970).

**Photographie 1:** Jarres utilisées dans notre étude

### II-5-2- Préparation des jarres de Léonard

Des bouteilles d'eau minérales en plastique sont choisies et coupées horizontalement en deux parties. Ces jarres sont lavées avec un détergent courant, puis désinfectées sous la hotte à flux laminaire par un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis dans l'éthanol 95°.

Les bouchons ont été percés au milieu à l'aide d'une pince. Les deux parties de la bouteille sont reliées par un cordon de compresse.

Les bouchons et les cordons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

### II-5-3- Préparation du mélange : Sable – Vermiculite

Un sable de rivière est lavé jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée. D'autre part la vermiculite est lavée au moins 10 fois puis séchée à l'air libre et enfin moulue dans un mixeur de cuisine.

Le sable est mélangé avec la vermiculite au 1/3, puis humidifier le mélange avec la solution nutritive de Fahraeus (**Annexe1**) ; stériliser le tout à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

La partie supérieure des jarres est rempli par le mélange alors que la partie inférieure contient la solution nutritive de Fahraeus.

Donc le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le mélange avec la solution nutritive.

#### **II-5-4- La récolte des graines**

La récolte des graines est faite pendant le mois de juillet sur le même site de la collecte des nodules suivie d'un décortilage.

#### **II-5-5- Stérilisation des graines**

Avant de procéder à la stérilisation des graines, il faut tout d'abord les sélectionner, ils doivent être non endommagés, propre et de taille identique.

La stérilisation se fait selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) comme suite :

- Dans un flacon stérile, mettre les graines avec de l'éthanol 95% pendant 5 à 10 second.
- Transférer les graines immédiatement dans l'acide sulfurique concentré pendant 3 minutes.
- Rincer les graines 10 fois à l'eau distillée stérile, et après le dernier rinçage, on les laisse gonfler pendant 1 heures.

#### **II-5-6- Germination des graines**

Après stérilisation des graines, elles sont mises en germination sur boîtes de TYA (Beringer, 1974) à l'obscurité total (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 2 à 3 jours, jusqu'à apparition des radicules (Photographie 2).



**Photographie 2:** Germination des graines de Fenugrec sur milieu TYA.

## **II-5-7- Inoculation des jarres**

Après une bonne germination des graines, on sème 2 à 3 graines par jarre, les semis sont prélevés grâce à l'anse de platine immergée dans l'éthanol puis flambée et refroidie et les plantée dans le mélange sable – vermiculite.

Les jarres sont ensuite inoculés avec 2ml de la suspension bactérienne cultivée sur bouillon YMB de 24 heures à 30°C. La partie supérieure des jarres est couverte avec du plastique noir pour éviter toute exposition des racines à la lumière.

Enfin, les jarres sont placés dans une chambre de culture.

L'irrigation des jarres s'effectue aseptiquement à chaque fois que le niveau de la solution nutritive a diminué.

Après environ 8 à 10 semaines, les plantes sont récoltées, les racines sont rincées afin d'observer le résultat de la nodulation.

## **III- Caractérisation phénotypique des isolats**

### **III-1- Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium***

Ces tests biochimiques permettent de différencier le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium*. (Jordan, 1984).

#### **III-1-1- Test du 3-cétolactose**

Ce test basé sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides (Bernaerts et De Ley, 1963). Seul les souches de *Agrobacterium* produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase. Après repicage dans le milieu TY, les souches sont cultivées à 28°C pendant 3 jours sur le milieu suivant :

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Après l'inoculation prélève à l'aide d'une anse et on ensemence sur le milieu suivant :

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Les boîtes sont incubées pendant 2 jours à 28°C.

Pour révéler les résultats il est nécessaire d'inonder les boîtes avec le réactif de Benedict qui se compose de :

Citrate de sodium	173g
Carbonate de sodium anhydre	100g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	17.3g
Eau distillée	1000ml

Les souches appartenant au genre *Agrobacterium* produisent l'enzyme 3-Cétolactose qui se manifeste par la formation d'un halo jaune autour des colonies. Celle du genre *Rhizobium* ne réagissent pas.

### III-1-2- Précipitation du glycérophosphate de calcium (Hofer, 1994)

C'est un autre test de différenciation entre les deux genres.

Les isolats sont cultivé et incubé 1à3 jours à 30°C sur milieu Mannitol-Calcium Glycérophosphate qui se compose de :

KNO <sub>3</sub>	5g
NaCl	3.8g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1g
KCl	0.16g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.6g
Ca- Glycérophosphate	0.8g
Mannitol	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

La croissance des souches du genre *Rhizobium*, donne des colonies entourées d'un halo clair ; celles du genre *Agrobacterium* donnent un halo brunâtre.

### **III-1-3- Croissance sur Litmus milk (lait tournesolé)**

Les réaction sur litmus milk (après 1 à 6 semaines) sont utilisées pour la mise en évidence d'une protéolyse acide ou alcaline, par la présence d'un halo clair autour des colonies (développement d'une zone de digestion du sérum) ( Vincent, 1970) caractéristique des souches de *Rhizobium*.

Les formes non rhizobial ou contaminantes se reconnaissent par une croissance rapide sur ce milieu, le plus souvent accompagnée d'une décoloration du lait.

Pour la préparation du milieu, il est nécessaire de stériliser séparément à 110°C pendant 10 minutes les deux solutions :

**Solution 1** : contient 20g de lait tournesolé dans 100ml d'eau.

**Solution 2** : contient 3g d'agar dans 100ml d'eau.

Les deux solutions refroidies à environ 50°C sont mélangées, pour constituer le milieu de culture.

Les bactéries sont ensemencées sur boîtes et incubées à 28°C pendant 15 à 20 jours. Il est mis en évidence la formation d'une zone de protéolyse claire autour des colonies. L'acidification du milieu est en outre accompagnée de l'apparition d'une couleur rose.

### **III-2- Tests nutritionnels**

#### **III-2-1- Utilisation des sucres comme seul source de carbone**

Ces tests ont été mis en œuvre sur milieu YMB où l'extrait de levure à été réduit à 0.05g/l et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Xylose, Arabinose, Fructose, Galactose, Maltose, Glucose, Lactose, Raffinose, Sorbitol, Saccharose (Vincent., 1970).

On ensemence les différents milieux et on incube à 28°C dans un bain-marie avec agitation pendant 24h, puis mesurer la DO à 600nm.

#### **III-2-2- Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote**

Les souches sont cultivées sur le milieu Défini 8 (Vincent, 1970) (**Annex1**) où le Glutamate de sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants : Valine, Tyrosine, Histidine, Proline, Thréonine, Isoleucine, Phénylalanine, Tryptophane, Lysine, Glycine, Sérine, Histidine, Arginine, Méthionine, Alanine, Asparagine et Cystéine.

Les tubes sont inoculés, incubés à 28°C et la croissance mesurée à 600nm après 24h.

### **III-2-3- Besoin en vitamine**

Les souches sont cultivées sur le milieu BIII (Dazzo, 1982) (**Annex1**) où la solution stock des vitamines est remplacée par une solution stock contenant seulement une des vitamines suivantes : Riboflavine, Acide p-aminobenzoïque, Acide nicotinique, Biotine, Thiamine-HCl, Panthotenate de Ca, Perydoxine.

Incuber à 28°C avec agitation pendant 24h et mesurer la DO à 600nm.

### **III-3- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)**

#### **III-3-1- Réduction des nitrates**

Les souches sont cultivées sur le bouillon TY contenant 0.1% de KNO<sub>3</sub> (p/v), et incubées pendant 4 jours à 28°C ; après incubation sont ajouté 3à4 goutte des réactifs I et II.

Après addition des réactifs I et II, s'il y a une coloration rouge, les souches ont une nitrate réductase+ ; si non, on rajouter la poudre de zinc et on note la couleur (la couleur rouge signifie la non réduction des nitrate, alors que un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche à le nitrate réductase).

#### **III-3-2- Hydrolyse de l'urée**

Les souches sont cultivées sur milieu YMA, contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012g/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 incubation à 30°C pendant 48h.

#### **III-3-3- Activité pectinolytique**

Les souches sont cultivées à 30°C pendant 7 jours sur YMA où le mannitol est remplacé par l'inositol 0.1% et 0.2% de pectine.

Après incubation les boîtes sont rincées délicatement avec l'eau courante puis avec une solution de rouge de Rithénium 0.05% pendant 30 minutes. Un halo clair autour des colonies indique la présence d'une Polygalacturonase.

#### **III-3-4- Activité cellulolytique**

Les souches sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% de CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pendant 5jours.

Après incubation les boîtes sont rincées avec l'eau courante puis inondées d'une solution de NaCl 1M et laissées pendant 30minutes à température ambiante.

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

### **III-4- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)**

#### **III-4-1- Tolérance au NaCl**

Pour étudier la capacité des isolats à l'osmotolérance, les souches sont cultivées sur milieu Lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989) (**Annexe1**), avec différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%) (p/v) (85.5mM, 171mM, 342mM, 513mM, 1710mM).

- Incubation à 28°C avec agitation pendant 24h.
- Mesurer la DO à 600nm.

#### **III-4-2- Effet de la température**

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimale de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C.

#### **III-4-3- Effet de pH**

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 10).

La DO est mesuré après 24h d'incubation sous agitation à 28°C.

### **III-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques**

#### **III-5-1- Métaux lourds**

Pour déterminé la concentration minimale inhibitrice en cultivant les différents isolats sur milieu TY contenant différentes concentrations de métaux lourds suivants : HgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> et SbO<sub>3</sub> de 0.5 à 8000µg/ml de TYA. L'incubation se fait pendant 3 à 7 jours à 28°C.

#### **III-5-2- Antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques à été fréquemment utilisée dans l'étude des *Rhizobium*, comme un moyen d'identification (Beck *et al.*, 1993).

La méthode utilisée est celle de dilution en milieu gélosé utilisant des stocks de solutions d'antibiotique rajoutées au milieu refroidi à 45°C.

**NB :** Pour préparer un solution stock en dissolvant 1g d'antibiotique dans 100ml de solvant correspondant.

La solution préparée est stérilisée par filtration (filtre 0.22µm). L'incubation varie de 1 à 7 jours selon l'antibiotique.

Les antibiotiques utilisés sont : Spectinomycine, Erythromycine, Rifampicine, Gentamycine, Streptomycine, Kanamycine, Chloramphénicol, de 0.5 à 5000µg/ml de TYA.

**Tableau 3:** les solvants des antibiotiques utilisés

<b>Antibiotiques</b>	<b>Solvants</b>
Spectinomycine	Eau distillée
Erythromycine	Ethanol 95%
Rifampicine	Ethanol 95%
Gentamycine	Eau distillée
Streptomycine	Eau distillée
Kanamycine	Eau distillée
Chloramphénicol	Ethanol 95%

### **III-6- Sensibilité aux phages**

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) et est réalisée en deux étapes :

#### **III-6-1- Isolement des bactériophages**

Collecter des échantillons de sols provenant des lieux de récolte des différentes populations du genre *Trigonella* L utilisées dans cette étude : Les stocker à 4°C au réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation.

**Tableau4:** les sols provenant des lieux de récolte des différentes espèces du genre *Trigonella*.

Sol	Souche correspondante
<b>Bin EL OUIDENNE</b> <b>SKIKDA</b>	<b>TB1</b>
	<b>TB4</b>
	<b>TB10</b>
<b>FAKHET</b> <b>SKIKDA</b>	<b>TF1</b>
	<b>TF2</b>
<b>AMIRA ARRASE</b> <b>MILA</b>	<b>TM6</b>
	<b>TM8</b>
	<b>TM11</b>

- Préparer des flacons contenant 150ml de MNB stérile (**Annexe 1**).
- Inoculer des flacons avec les souches (5%) et incuber dans un bain Marie agité 28°C pendant 18-20 heures.
- Ajouter à la phase exponentielle de croissance 1g de sol au flacon et incuber dans un bain Marie agité 28°C pendant 18-20 heures.
- Séparer les cellules et le sol par centrifugation (10000 t/min) pendant 15 min.
- Filtrer le surnageant à travers une membrane filtre stérile (0.45µm).
- Ajouter 10ml de filtrat à une culture fraîche de la même souche bactérienne et incuber dans un bain Marie agitateur 28°C pendant 18-20 heures.
- Centrifuger et filtrer, répéter cette opération 2 fois de plus.
- Mettre le dernier filtrat dans des tubes à raison 10ml par tube, ajouter 2ml de chloroforme et stocker à 4°C.

### **III-6-2- Analyse des phages**

Ensemencer les souches dans le MNB. Après 3jours d'incubation, étaler 0.1ml de la culture sur une boîte de Pétri contenant le milieu MNA (**Annexe 1**). Une anse de chaque suspension de phage est déposée sur la couche bactérienne. La localisation des dépôts est marquée sur le dos de la boîte. Laisser sécher pendant 10-15 min. Retourner les boîtes et incuber à 30°C pendant 24-48 heures.

## **IV- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE**

### **IV -1- Protocole**

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970). Une aliquote de 100µl de chaque culture bactérienne en phase de croissance exponentielle sur milieu TY est centrifugée à une vitesse de 700 tour/minute pendant 15 minutes à 4°C, puis le culot est mis en suspension dans 50µl de tampon de lyse (**Annexe 1**).

#### **- Préparation des plaques de gel**

Monter les plaques dans le couleur.

- couler le resolving (**Annexe1**) et recouvrir d'eau + Butanol
- retirer l'eau + alcool et couler le staking (**Annexe1**)
- placer rapidement les peignes
- laisser polymériser, démonter et retirer les peignes
- placer 1 ou 2 plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir avec le tampon de migration.

Soumis la suspension du tampon de lyse à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (**Annexe1**).

Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de comassie et l'acide trichloracétique 60% pendant une nuit sous une faible agitation.

Enfin le gel est décoloré dans de l'eau distillée sous faible agitation jusqu'à l'apparition des bandes polypeptidiques.

# Chapitre III

## Résultats et Discussion

## **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 rhizobiums les mieux étudiés, la base de la description formelle de taxon, depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme *et al.*, 1996). Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005).

En dehors de ces informations utiles et utilisables dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphasique, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches efficaces, compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux. Ainsi, ces approches d'ordre fondamental et pratique permettent la détermination d'une inoculation efficace et bénéfique pour les plantes hôtes.

## **I- Caractères cultureux**

La majorité des nodules de *Trigonella* L a donné des bactéries qui ont bien poussé sur le milieu YMA. Les 10 isolats ont des formes circulaires, convexe avec un diamètre de 0.5 à 10 mm et de couleur translucide à opaque (Planche 2). Sauf les colonies de la souche TB4 qui est de forme irrégulière et sèche au début.

Sur le milieu YMA+RC, les isolats n'absorbent pas le rouge de Congo et restent ainsi blanches rarement roses (Planche 2). Sauf la souche TB4 qui est d'une couleur rouge après une absorption plus importante de rouge de Congo.

En prenant pour critère leur vitesse de croissance, les colonies obtenues sur YMA sont bien visibles après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C pour TF1, TF2, TF5, TB4 ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide. Et 3 à 5 jours pour TB1, TB7, TB10, TM6, TM8 et TM11 qui présentent une croissance lente.

Sur le milieu GPA, le développement des bactéries se fait sans acidification du milieu après 24 heures.

En fait, le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du BTB vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali, 2006).

Nos isolats modifiant partiellement le pH sur milieu YMA+BTB après 24 heures d'incubation, mais après 48h les souches acidifient totalement le milieu dans les boîtes (Planche 2). La production de l'acide et l'alcalin dans le milieu YMA a été utilisée comme un

outil pour indiquer le caractère général de *Rhizobium* (Pagano, 2008). 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 ; Beck *et al.*, 1993 ;Pagano, 2008).

#### **- Détection de la production des EPS**

L'observation des souches testées sous une lampe aux rayons ultraviolets montre que toutes les souches apparaissent fluorescentes c'est-à-dire productrices des EPS.

En soumettant les souches au Calcofluor, les colonies des souches productrices d'EPS apparaissent fluorescentes sous ultraviolet, tandis que les colonies qui ne secrètent pas d'EPS ne sont pas fluorescentes (Jordan, 1984 ; Struffi *et al.*, 1998).

#### **- Examen microscopique**

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram est réalisée, qui va permettre de visualiser les bactéries au microscope optique. L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets roses Gram négatif (Planche 2).

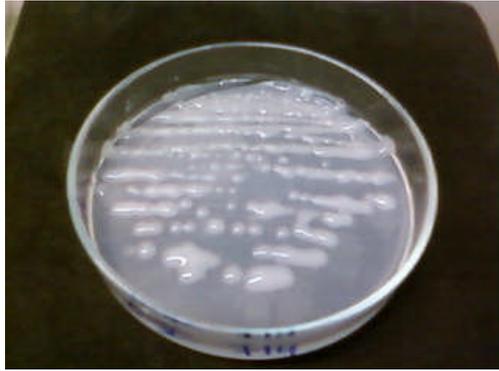
#### **- Mobilité des souches**

Aussi bien que l'ensemencement des isolats sur le milieu Mannitol mobilité confirme que les souches isolées sont mobiles avec une acidification du milieu et production importante du gaz apparaît (Planche 2). Ainsi que l'observation microscopique des isolats à l'état frais confirme leur mobilité.

## **II- Authentification des isolats**

Ce test a été effectué afin d'évaluer la diversité des souches de fenu grec par leur potentiel infectieux et fixateur et afin de repérer les souches les plus efficaces.

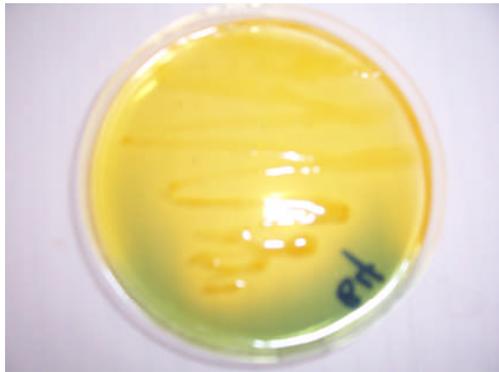
La capacité symbiotique d'une souche de *Rhizobium* est évaluée par deux paramètres : son infectivité et son efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de



Croissance sur YMA



Croissance sur YMA+RC



Croissance sur YMA+BTB



Résultat de Mannitol mobilité



Coloration de Gram

**Planche 2** : Caractères cultureux et microscopiques des souches isolées

nodules formées sur la racine de chaque plante. L'efficacité est estimée par la détermination du pourcentage de gain en matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées (El Hilali, 2006)

L'expérience a été menée dans les jarres de Léonard pour permettre le bon développement du système racinaire et pour évaluer la capacité de nos souches de former des nodules sur les racines des différents échantillons de *Trigonella L* prélevés dans les trois régions de l'Est algérienne Bin El Ouidenne, Fakhete et Amira Arresse.

L'inoculation de nos isolats avec leur légumineuse d'origine nous permet de vérifier leur appartenance aux bactéries nodulant les légumineuses (BNL), ceci a été montré par la formation des nodules sur les racines de la légumineuse hôte d'origine.

Les plantes ont été déterrées au même stade végétatif afin que les performances symbiotiques puissent être comparables.

Après une période de culture de deux à trois mois dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées, les plantes sont prélevées pour évaluer le taux de nodulation pour chaque souche et dans chaque pied.

La croissance des plantes s'est déroulée correctement jusqu'au moment de la récolte. La partie aérienne est bien développée avec des feuilles vertes et de taille importante (jusqu'à l'apparition des fleurs dans la plupart des pieds ainsi que quelques gousses) (planche3), la partie racinaire présente une stimulation même en absence des nodules.

La croissance des parties aériennes du fenugrec est très faible jusqu'au début de la floraison, date à partir de laquelle elle devient rapide et régulière. Les premières nodosités sont visibles 70 jours après le semis alors que la plante est encore au stade « une feuille trifoliée » (Desperrier, 1986)

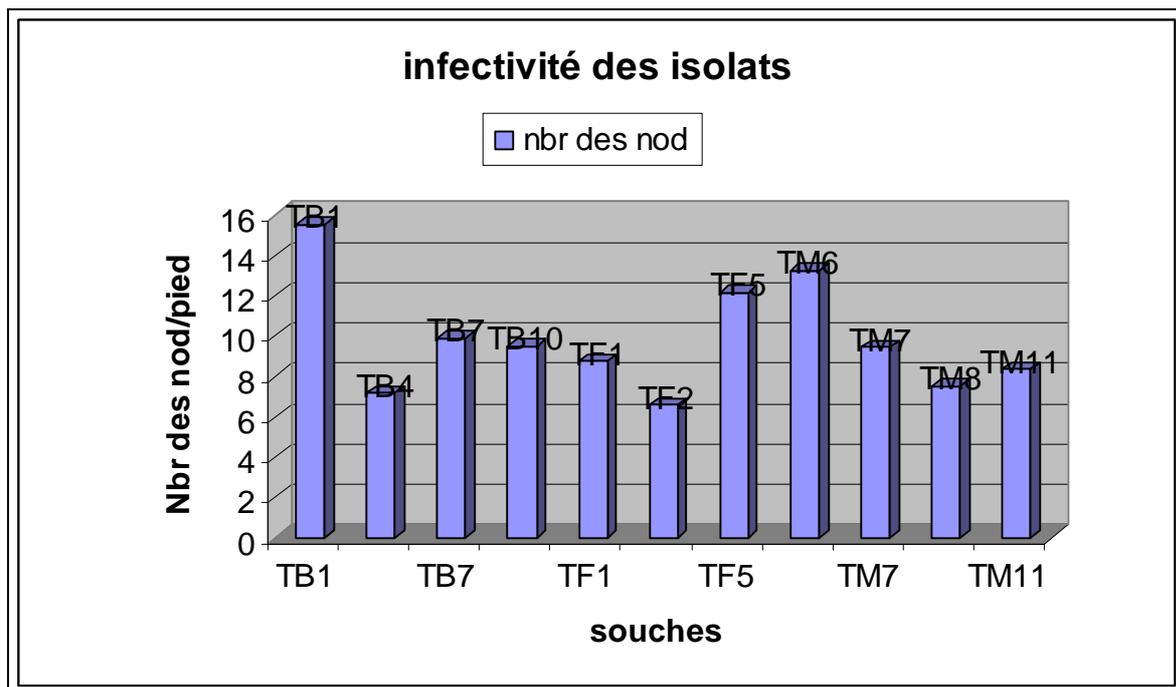
A cause de l'échec du processus de la nodulation et pour confirmer l'infectivité des isolats, on a répété le test de nodulation deux fois et les résultats sont réunies dans les tableaux 5 et 6.

**Tableau 5: Résultats du premier test de nodulation**

<b>souche</b>	<b>Date d'inoculation</b>	<b>Date de prélèvement</b>	<b>Nombre de pieds</b>	<b>Nombre de palettes/pied</b>	<b>Nombre de nodules/pied</b>
<b>TB1</b>	09/11/2009	22/01/2009	3	0	5
				0	2
				1	3
<b>TB4</b>	09/11/2009	26/01/2009	3	0	1
				1	2
				2	3
<b>TB7</b>	09/11/2009	31/01/2009	2	0	16
				1	5
<b>TB10</b>	09/11/2009	31/01/2009	2	0	8
				3	26
<b>TF1</b>	09/11/2009	31/01/2009	3	0	7
				0	10
				0	7
<b>TF2</b>	09/11/2009	03/02/2009	3	3	3
				1	3
				2	8
<b>TF5</b>	09/11/2009	27/01/2009	3	5	13
				3	7
				0	0
<b>TM6</b>	09/11/2009	03/02/2009	2	4	7
				5	15
<b>TM7</b>	09/11/2009	03/02/2009	3	0	5
				0	9
				2	11
<b>TM8</b>	09/11/2009	03/02/2009	2	0	11
				2	5
<b>TM11</b>	09/11/2009	18/01/2009	3	1	0
				0	0
				1	3

**Tableau 6:** Résultats de deuxième test de nodulation

<b>souche</b>	<b>Date d'inoculation</b>	<b>Date de prélèvement</b>	<b>Nombre de pieds</b>	<b>Nombre de palettes/pied</b>	<b>Nombre de nodules/pied</b>
<b>TB1</b>	27/01/2009	27/04/2009	03	3	31
				2	9
				0	43
<b>TB4</b>	22/03/2009	21/05/2009	03	1	8
				1	15
				2	15
<b>TB7</b>	22/02/2009	19/05/2009	02	2	7
				0	15
				0	4
<b>TB10</b>	22/03/2009	21/05/2009	03	0	13
				0	2
				0	4
<b>TF1</b>	27/01/2009	27/04/2009	02	1	4
				2	12
				0	5
<b>TF2</b>	27/01/2009	27/04/2009	02	03	13
				0	06
				0	10
<b>TF5</b>	27/01/09	27/04/2009	03	0	7
				2	18
				2	23
<b>TM6</b>	27/01/2009	30/04/2009	03	0	12
				0	19
				0	14
<b>TM7</b>	27/01/2009	30/04/2009	02	0	14
				0	07
				0	3
<b>TM8</b>	27/01/2009	03/05/2009	03	0	9
				0	9
				0	9
<b>Tm11</b>	27/01/2009	03/05/2009	03	0	12
				1	15
				0	20



**Figure 12:** Taux d'infectivité des isolats

Nous avons étudié le spectre d'hôte de l'ensemble des souches sur la légumineuse *Trigonella* L. Les tableaux 5, 6, montrent que toutes les souches isolées de *Trigonella* L forment des nodules, 99 % des souches induisent une nodulation chez *Trigonella* L. L'effectivité ou la capacité des souches bactériennes à fixer l'azote en symbiose est repéré par l'état de développement de la partie aérienne de chaque pied et aussi le nombre des pieds qui ont poussé dans chaque jarre (Tableaux 5 et 6).

La figure 12, montre que les mêmes souches forment des nodules efficaces. Néanmoins, on constate une grande diversité dans l'effectivité des souches. Cette diversité n'est corrélée ni à l'origine géographique des souches ni à leurs caractéristiques de croissance sur YMA. Cependant, il semble que les souches effectives sont celles de type de croissance rapide isolées et celles de type de croissance lente (Planche 3).



**Planche 3:** Résultats du test de nodulation

### **III- Caractérisation phénotypique des bactéries**

#### **III-1- Caractères distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium***

##### **III-1-1- Test du 3-cétolactose**

Après l'inondation des boîtes avec le réactif de Benedict, toutes les colonies restent toujours blanchâtre c'est-à-dire aucun halo n'est formé autour des colonies (Planche 7), ce qui indique que toutes les souches ne produisent pas l'enzyme de 3-cétogalactosidase et donc la non oxydation du C<sub>3</sub> du glycosyl des saccharides. Le même résultat est obtenu par Benhizia (2006) avec les bactéries nodulants les légumineuses du genre *Hedysarum* et deLajudie (1998) pour le genre *Allorhizobium*.

##### **III-1-2- Précipitation du ca-glycérophosphate**

Dans ce test nos isolats ne forment aucune précipitation avec le glycérophosphate de calcium. Ni brunissement (Planche 7). Ces résultats sont comparables à ceux indiquées par Struffi *et al.*, (1998) avec les souches de rhizobium nodulants la légumineuse *Hedysarum Coronarium*.

##### **III-1-3- Croissance sur Litmus milk**

Les souches du rhizobia sur ce milieu présentent une croissance lente, les colonies apparaissent dès le troisième jour et sont entourées d'un halo clair. Alors que les souches des Gammaproteobacteria présentent une croissance rapide avec une décoloration du milieu de culture.

Pour les isolats, la majorité des souches présentent le même comportement que les Gammaproteobactéria. Ces résultats sont similaires à ceux indiqué par Torche (2006).

#### **III-2- Tests nutritionnels**

##### **III-2-1- Source de carbone**

Les résultats obtenus montrent que les souches utilisent tous les sucres testés comme seul source de carbone mais avec une différenciation entre l'un et l'autre. Le Saccharose est le sucre le mieux assimiler par toutes les souches et en particulier les souches « TB » avec le Maltose, le Sorbitol et le Fructose. Aussi chez les isolat « TF ».

D'autre part nous avons signalé que les isolats « TM » sont plus similaire aux souches de références par ce qu'elles utilisent toutes les sucres avec une préférence au Mannitol, Maltose et Sorbitol (Planche 4) (Figure 13).

Toutefois, les rhizobiums diffèrent dans leur aptitude à assimiler les différentes sources de carbone (Allen et Allen, 1950).

L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches a indiqué que 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).

### **III-2-2- Source d'azote**

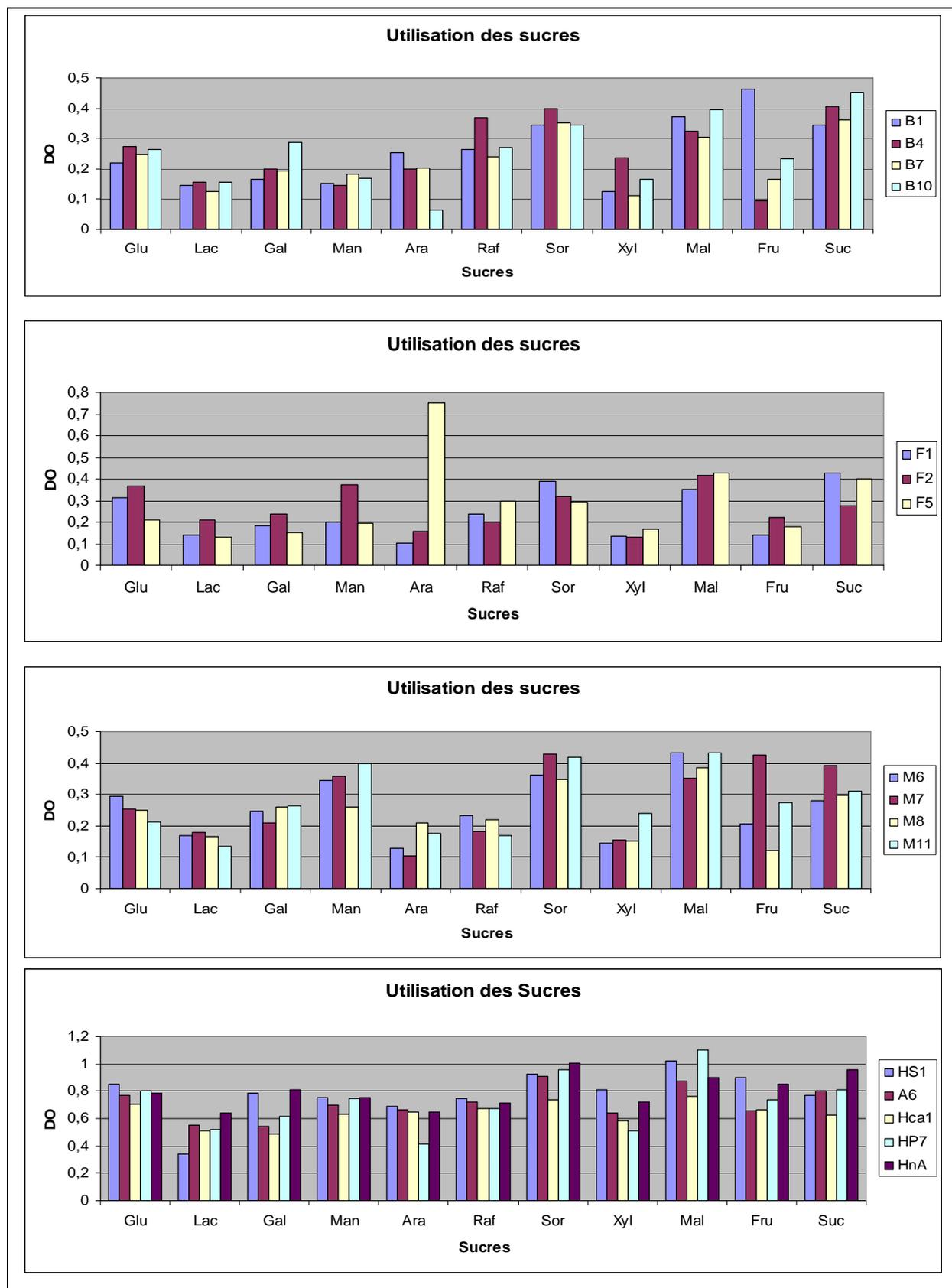
La croissance des souches sur le milieu défini 8 est variable selon la source d'azote et l'acide aminé additionné.

Les souches peuvent pousser en présence de la plupart des acides aminés comme source d'azote (Planche 5) (Figure 14).

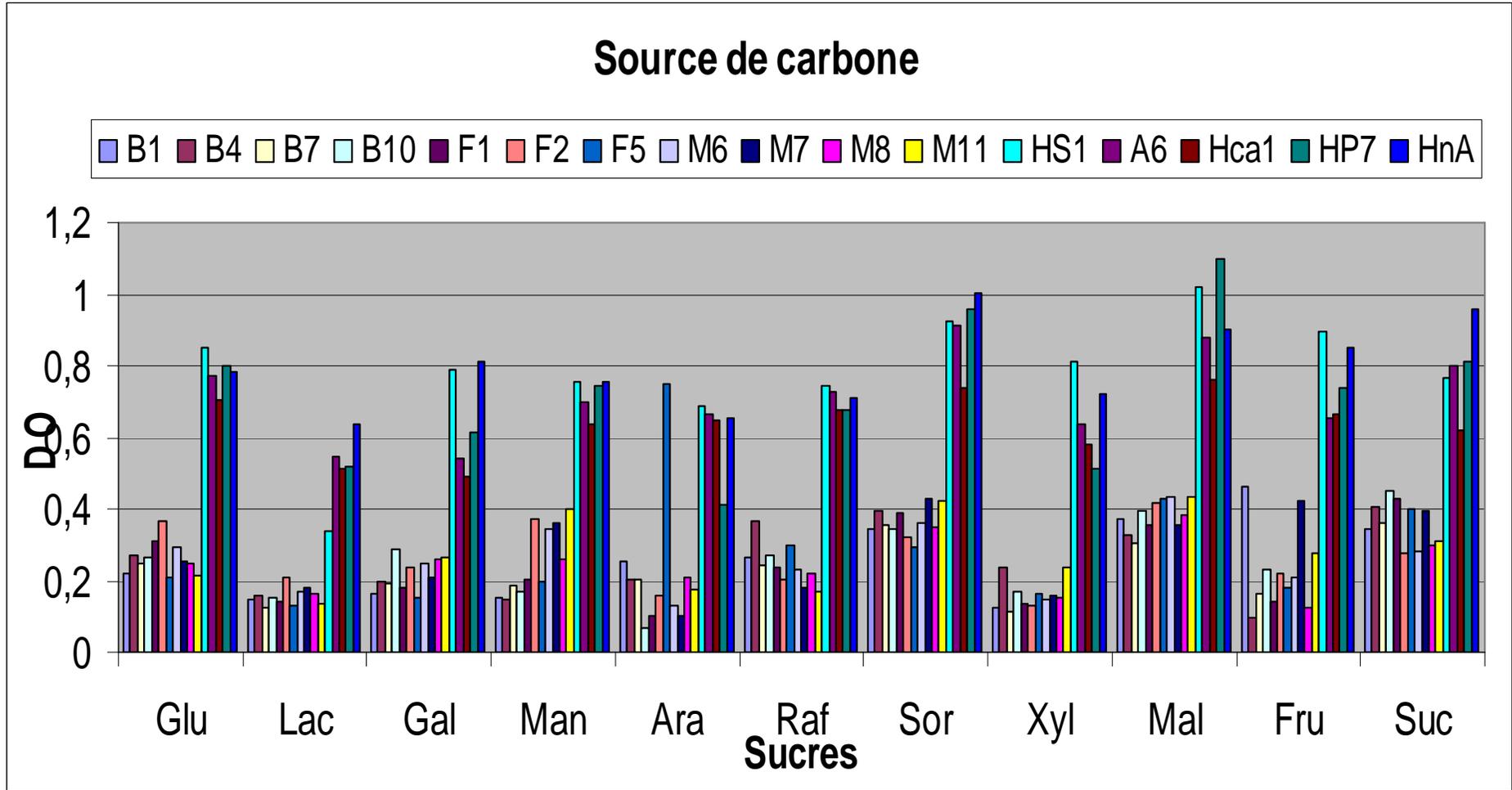
La majorité des souches n'utilisent pas la Thréonine et la Phénylalanine, le même comportement est observé aussi chez les souches de références. Par contre l'Alanine, l'Asparagine et le Cystéine sont les acides aminés les mieux assimilés par toutes les souches étudiées. Ces acides aminés sont classés biochimiquement parmi les acides aminés essentiels.

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

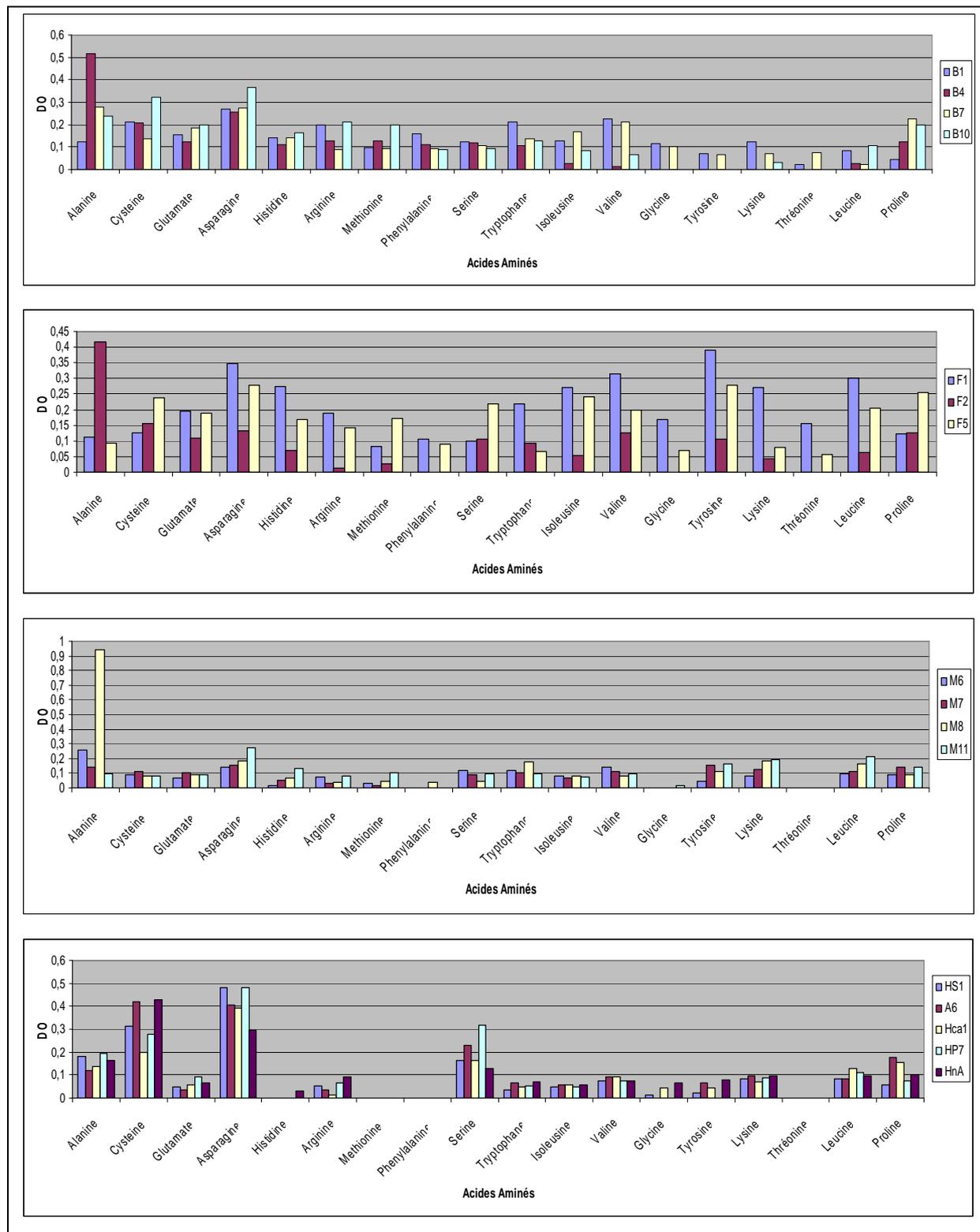
Struffi *et al.*, (1998) ont trouvé que la Thréonine ne peut être utilisée par les souches du *Rhizobium sllae*.



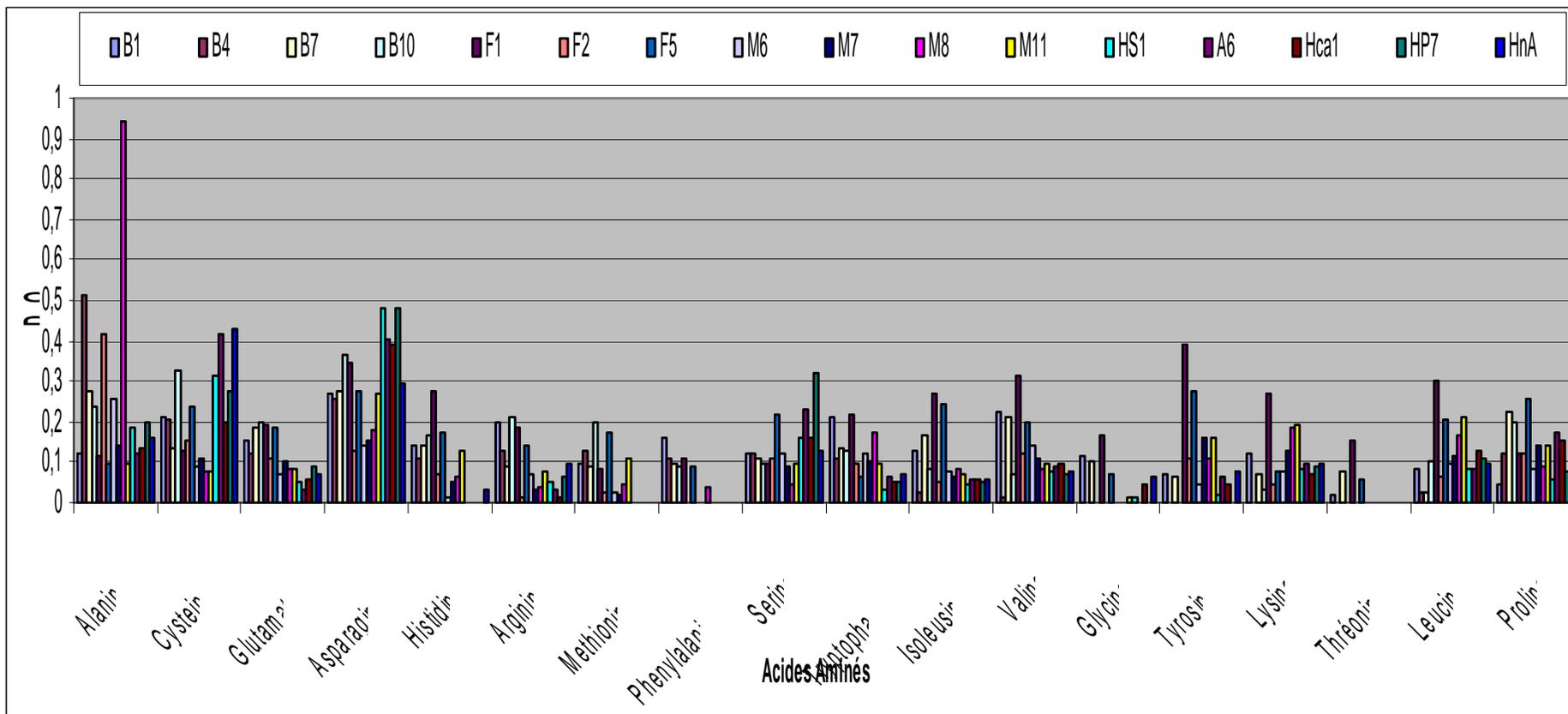
**Planche 4 :** utilisation des sucres comme source de carbone par le groupe de souches testées



**Figure 13:** Utilisation des sucres par toutes les souches testées.



**Planche 5 :** utilisation des Acides aminés comme source d'azote  
par le groupe de souches testées



**Figure 14:** Utilisation des Acides aminés par toutes les souches testées.

### III-2-3- Besoin en vitamines

Toutes les vitamines testées ont été utilisées par la majorité des souches et on remarque que la souche TF1 est en besoin à toutes les vitamines par contre la souche TB1 préfère la Riboflavine et HS1 utilise beaucoup la Pentothénate-ca (Planche 6) (Figure 15).

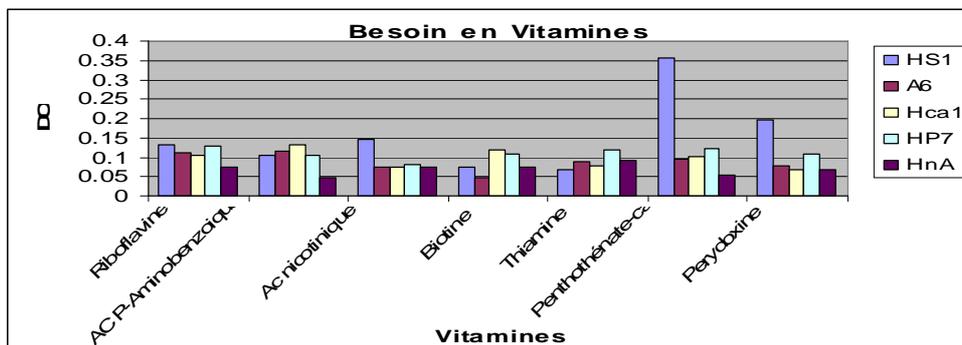
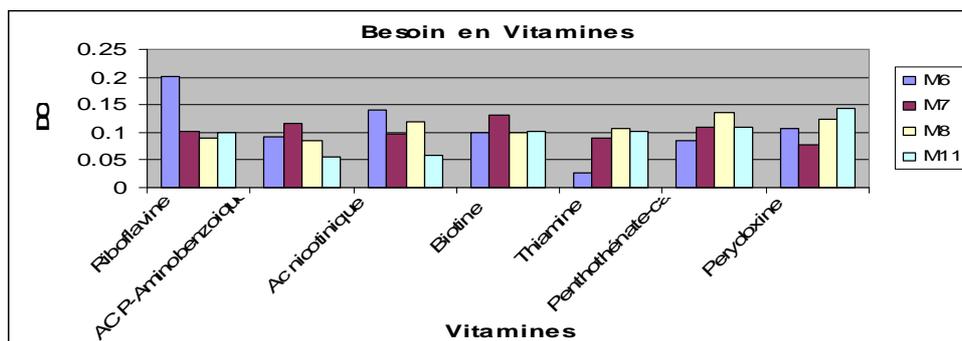
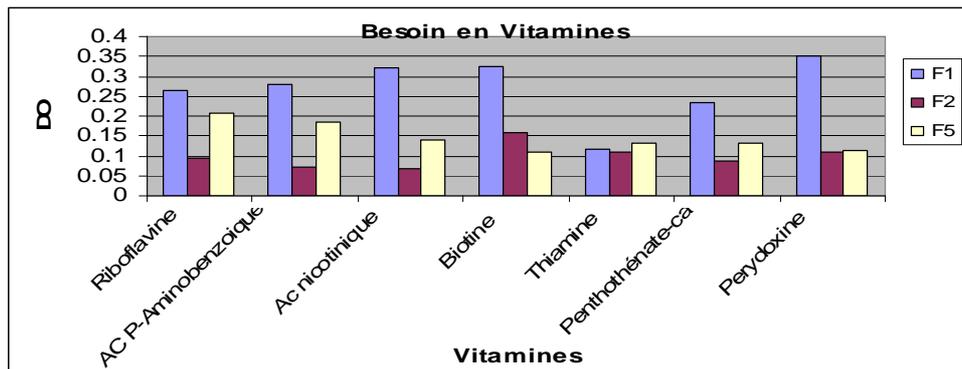
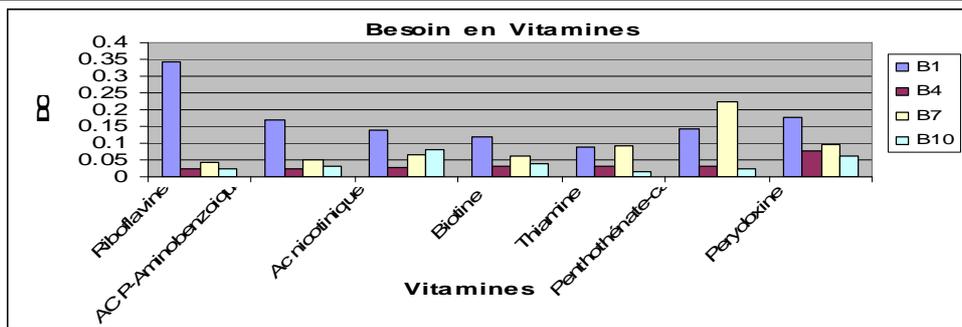
Werner (1992) démontre que le besoin en vitamines chez les rhizobia est très variable et qu'en général la croissance du *Bradyrhizobium* est stimulée par la biotine et celle de *Rhizobium* par la thiamine et la pantothénate. Les autres vitamines ne sont pas exigées pour la croissance des rhizobia.

La disponibilité des vitamines telles que la biotine, thiamine et riboflavine dans la rhizosphère limite la croissance de *Sinorhizobium meliloti* (Karunakaran *et al.*, 2006).

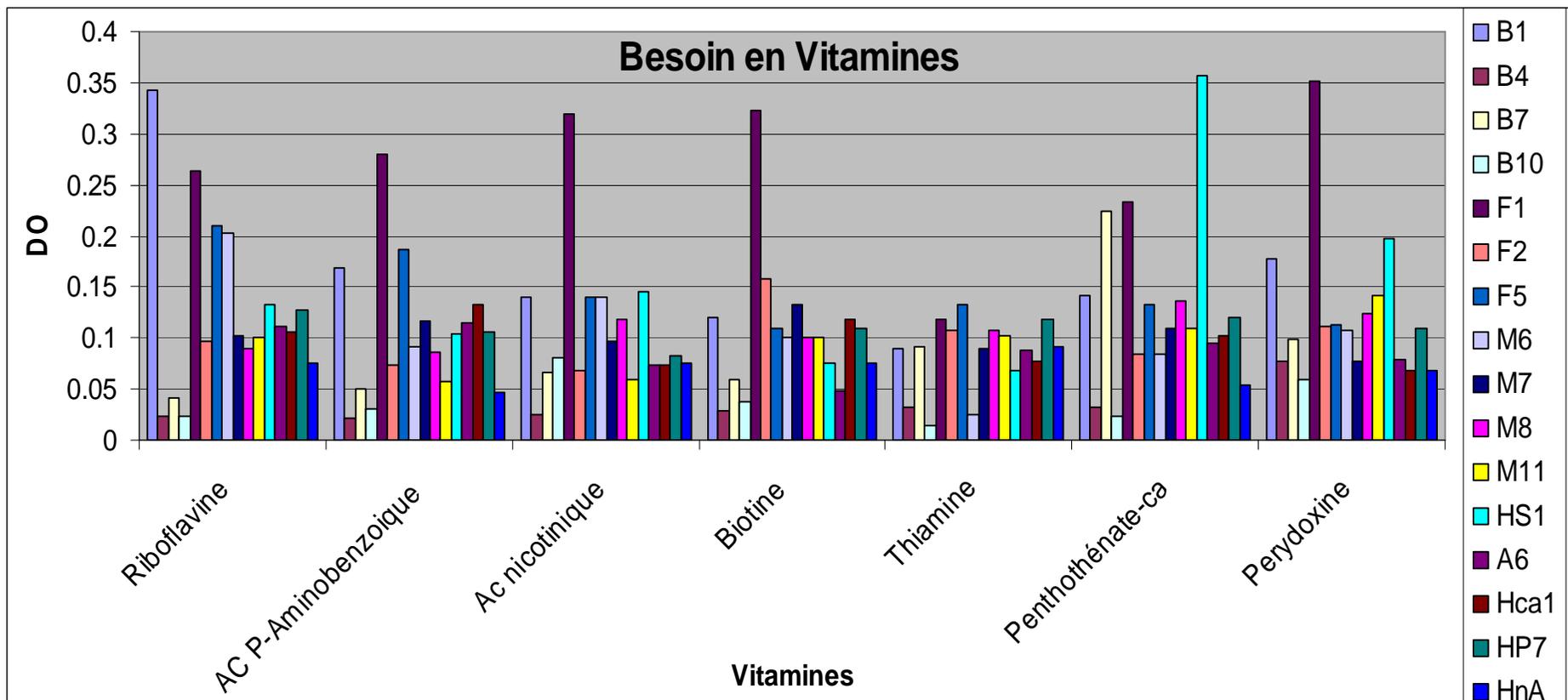
L'Auxotrophie aux vitamines a été également décrite comme la cause de la formation des nodules inefficaces par certaines souches de rhizobiums, mais la formation des nodules efficaces peut être restaurée par l'addition des vitamines à l'extérieur (Karunakaran *et al.*, 2006).

L'addition externe de la biotine améliore considérablement la croissance des bactéries et la colonisation des racines de la luzerne par *Sinorhizobium meliloti* (Karunakaran *et al.*, 2006).

Globalement, cela suggère que l'approvisionnement en vitamine limite la croissance des rhizobiums dans la rhizosphère et le sol (Karunakaran *et al.*, 2006).



**Planche 6:** Besoin en vitamines dans le groupe de souches testées



**Figure 15:** Besoin en vitamines de toutes les souches testées.

### III-3- Tests biochimiques

#### III-3-1- Réduction des nitrates

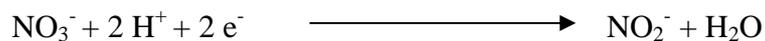
Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs nitrates I et II toutes les souches donnent une couleur rouge se qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites (Planche 7).

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue des caractères taxonomiques importants (Joffin *et al.*, 2006).

Cette étude consiste à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.

- deux réactifs de mise en évidence des nitrites, l'acide sulfanilique « nitrate I » et l'alpha naphtylamine ou naphtyl-1-amine « nitrate II » en solution dans de l'acide éthanoïque (acétique) concentré. Une coloration rouge signale la présence de nitrites dans le milieu. Elle est due à la formation de diazoïques. Ces réactifs portent le nom de réactifs de Griess (Joffin *et al.*, 2006).

La réduction des nitrates en nitrites utilisant un nitrate réductase :



Dans les milieux biologiques, la transformation des ions  $\text{NO}_3^-$  en ions  $\text{NO}_2^-$  ne peut s'effectuer que sous l'action d'une enzyme : la nitrate réductase qui est présente dans tous les organismes susceptibles de métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi que quelques espèces de levures et bactéries (Idrissi, 2006).

*Sinorhizobium meliloti* est une bactérie capable d'assimiler l'azote réduit de l'environnement ainsi que l'azote sous forme de nitrate ou nitrite. Lors de la symbiose, elle transforme ces composés en ammoniac qui est alors assimilable par la plante (Claudel-Renard, 2003).

L'assimilation du nitrite en ammoniac se fait par la voie du nitrite réductase (NADPH) (EC 1.6.6.4) qui permet de transformer le nitrite en ammoniac en une seule réaction. Les deux sous unités de l'enzyme sont bien identifiées sur le pSymb (Claudel-Renard, 2003).

Les isolats des nodules des deux plantes *Puraria tuberosa* et *Mucuna pruriens* produites le  $\text{NH}_3$  et réduites le nitrate (possèdent une activité de nitrate réductase) (Rathore *et al.*, 2009)

### III-3-2- 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 un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

Après l'incubation, les souches TB7, TF1 et TF5 acidifier le milieu en donnant des colonies rose sur un milieu vire le rouge (rouge de Phénol) ver le jaune (Planche 7).

Par contre les souches TB1, TB4, TB10, TF2, TM6, TM7, TM8 et TM11 donnent un autre aspect avec une couleur rose violet du milieu c'est-à-dire alcalinises le milieu (uréase +) (Planche 7). Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme dans l'équation (Guiraud, 1998).



La réaction rend compte de la production de deux moles d'ammoniac qui alcalinisent le milieu. Toutefois, la quantité supérieure d'ammoniac et sa meilleur solubilité conduisent à l'alcalinisation.

Techniquement, le résultat observé est donc une alcalinisation appréciée par le virage au rouge d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'enzyme peut être «constitutive», c'est-à-dire présente dans la bactérie indépendamment de celle de l'urée : l'enzyme sera révélée rapidement (quelques minutes 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).

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

### III-3-3- Activité pectinolytique

Après l'addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec l'eau, un halo clair est observé autour des colonies sur toutes les souches indiquant la possession d'une enzyme qui hydrolyse la pectine et une activité polygalacturonasique (planche 7).

Rathore *et al.*, (2009) déclare que sont les souches isolées à partir des nodules des plantes légumineuses *Puraria tuberosa* et *Mucuna pruriens* qui possèdent une activité de pectinasiq.

Deux enzymes : endoglucanase et polygalacturonase, dégradant les ponts glucidiques de la paroi cellulaire secrète par l'espèce du *Rhizobium sllae* (Struffi *et al.*, 1998).

#### **III-3-4- Activité cellulolytique**

Pour les souches de rhizobia, les colonies apparaissant sur un fond rouge entourés d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence l'activité cellulolytique, par contre pour les souches Gammaprotéobactéria, on remarque l'absence de l'halo et une activité cellulolytique négative.

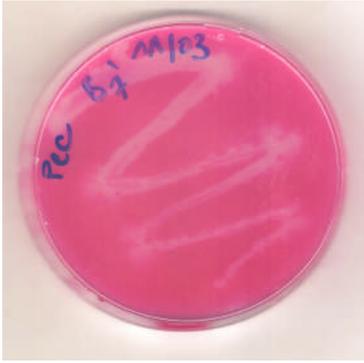
Le même résultat négatif est noté pour nos isolats sauf pour les souches TM8, TM11, TB7, TB10 qui donnent un résultat positif (Planche 7).

Les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* laissent apparaître une activité cellulolytique négative (Benhizia, 2006).

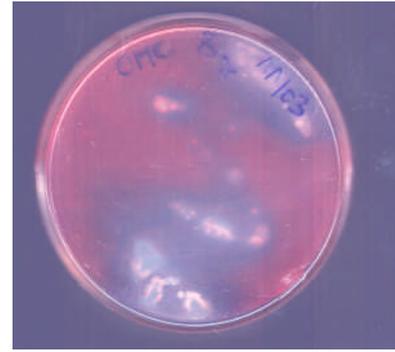
Mateos *et al.*, (1992) propose que l'enzyme de *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii dégrade à la fois la carboxyméthylcellulose et la polypectate substrat modèle. Il en résulte une dégradation localisée qui a complètement traversé la paroi des poils absorbants et facilité la pénétration directe des bactéries.

Plusieurs auteurs ont détecté CMC-ases dans différentes espèces de *Rhizobium* et ont démontré que la cellulase produite par *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii ANU843 est codée par le plasmide de symbiose (pSym) (José *et al.*, 2001).

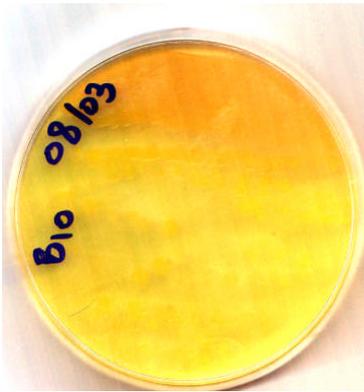
Jiménez-Zurdo *et al.*, (1996) ont confirmé la présence de l'activités d'enzymes cellulolytiques dans toutes les souches de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* étudiés (José *et al.*, 2001).



Test de Pectinase positif (+)



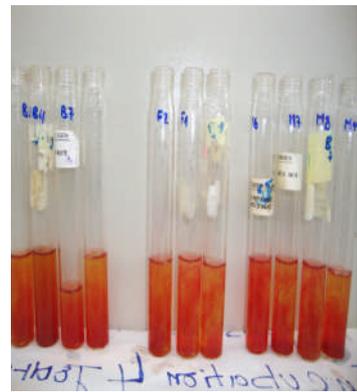
Test de cellulase positif (+)



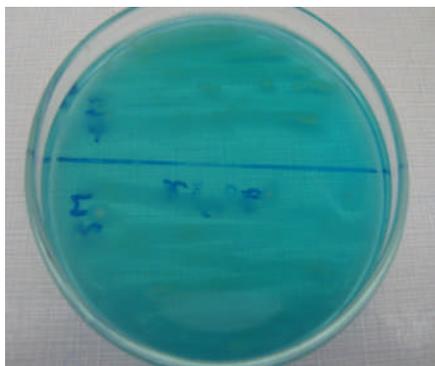
Test d'Uréase négatif (-)



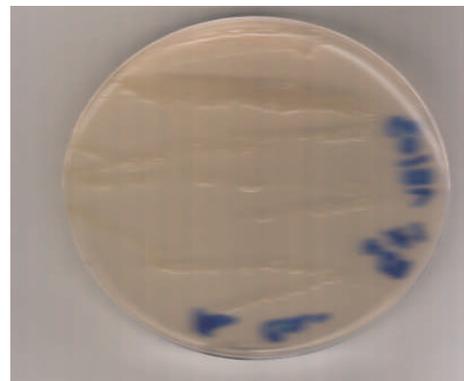
test d'Uréase positif (+)



réduction de nitrate positif (+)



Test de 3-cetolactose négatif (-)



test de Ca-glycerophosphate négatif (-)

**Planche 7 : Résultats de différents tests distinctif et biochimique**

### III-4- Tests physiologiques

#### III-4-1- Tolérance au NaCl

Les résultats obtenus montrent 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. Et par comparaison on observe que nos isolats sont plus halotolérants que les souches de références.

D'une façon globale, ces résultats montrent une variabilité relative de tolérance vis à vis de la salinité chez les souches étudiées dans ce travail (Planche 8) (Figure 16).

La croissance d'un nombre important des rhizobies est inhibée à 100mM de NaCl, alors que d'autres rhizobies comme *Rhizobium meliloti* peut tolérer jusqu'à 300 à 700mM de NaCl (Zahran, 1999). Les isolats des plantes *Acacia*, *Prosopis* et *Leucaena* tolèrent 500 à 850mM de NaCl (Tilak *et al.*, 2005).

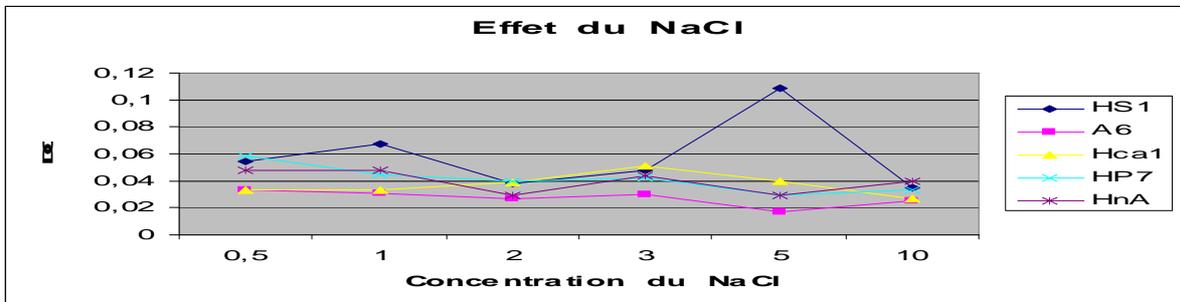
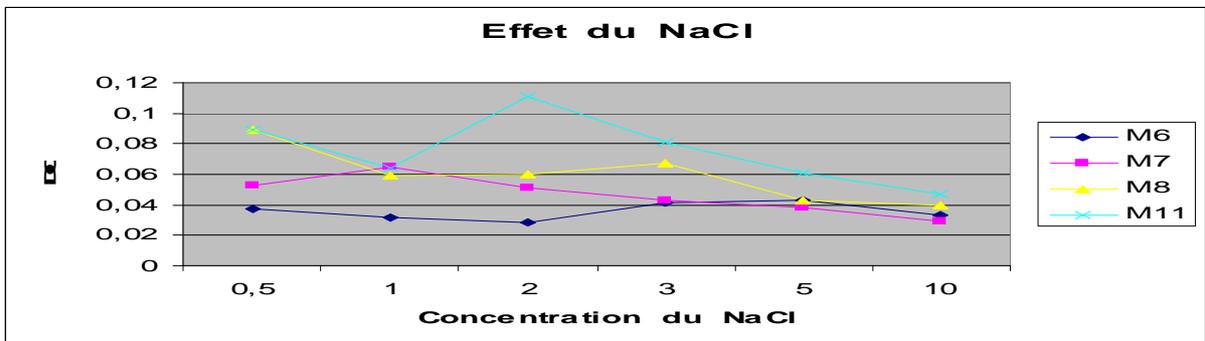
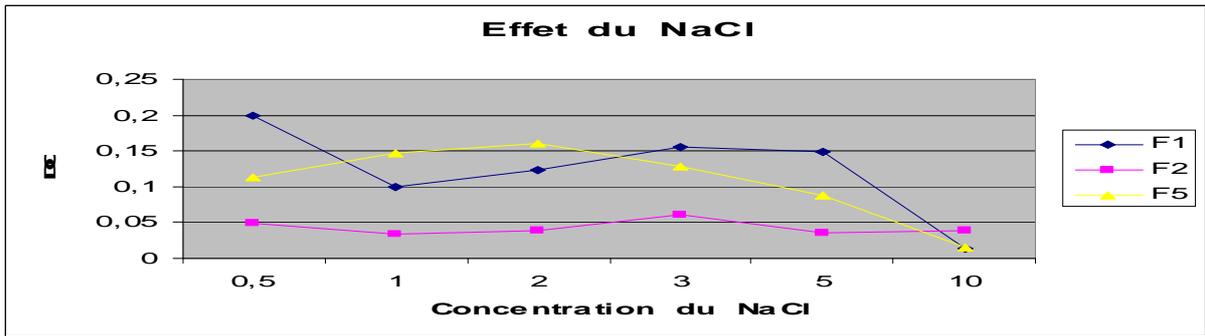
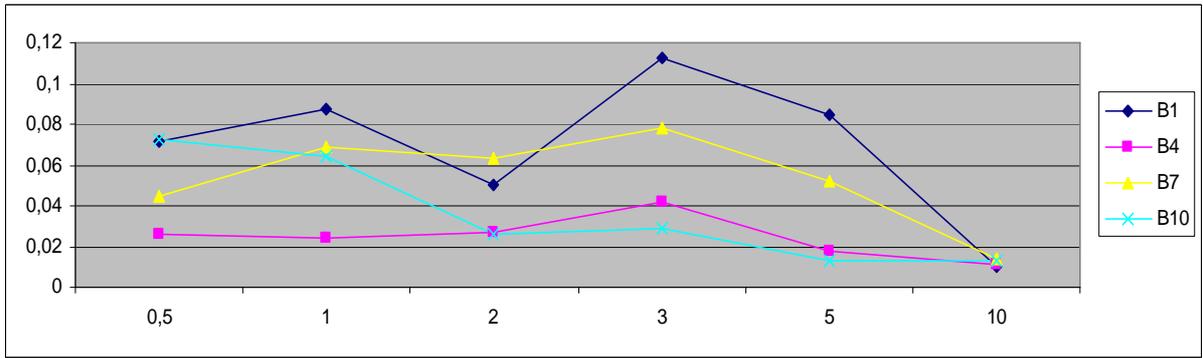
Les souches de *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* peuvent tolérer une concentration de NaCl supérieure de 1000mM (Elsidig, 1998).

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

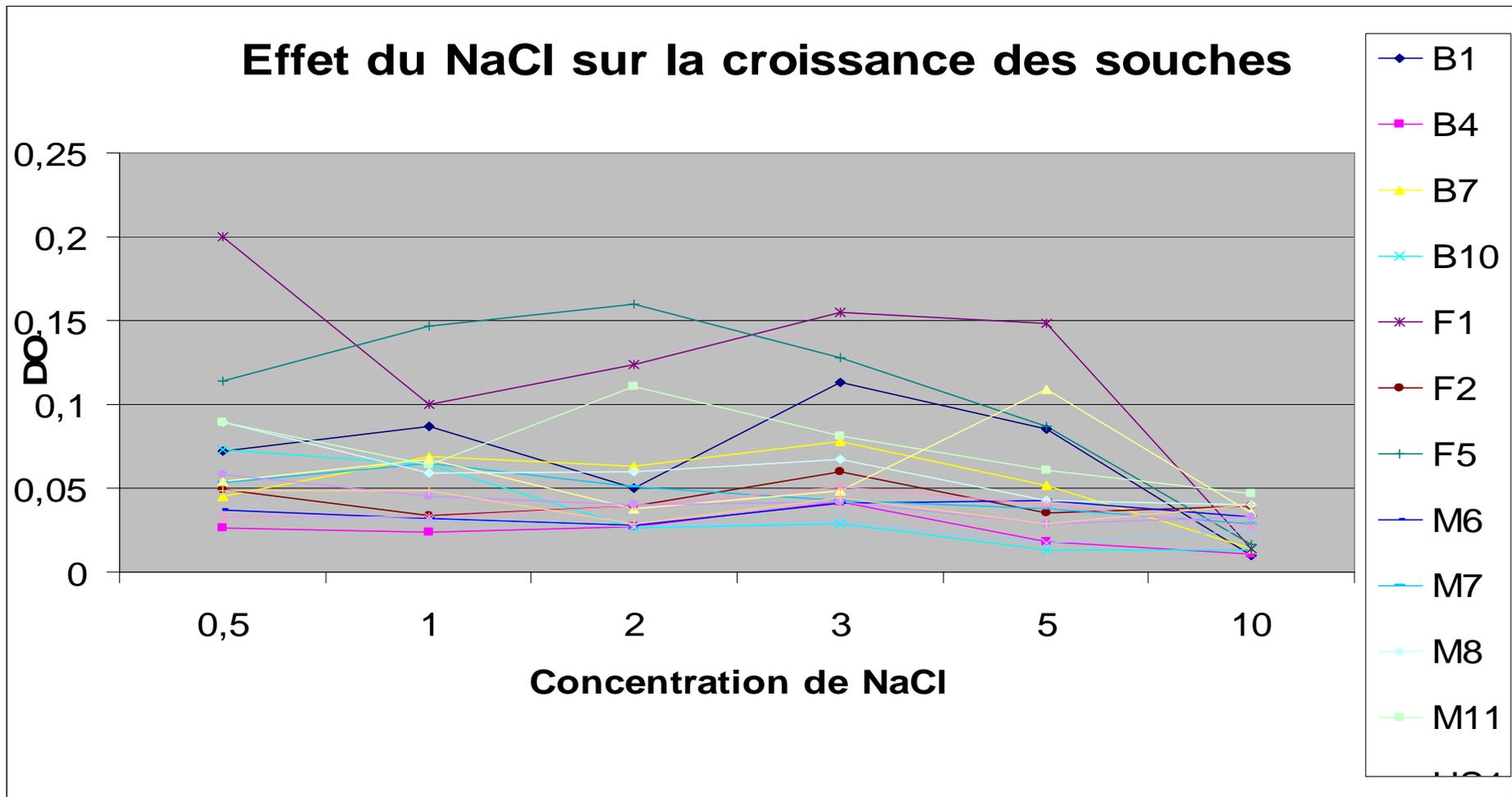
Les organismes s'adaptent au stress osmotique causé par de hautes concentrations extracellulaires en sel, en produisant des niveaux accrus de solutés intracellulaires appelés osmolytes, les solutés qui sont plus compatibles avec la fonction enzymatique intracellulaire de chlorure de sodium. Chez *Methanosarcina sp.* on a montré qu'ils s'accumulent principalement de potassium, un glutamate à partir d'une concentration extracellulaire de sel plus de 500 mM et les zwitterioniques amino acides dérivés de l'acide *N*-acétyl-L-lysine dans des concentrations plus élevées de sel (Brabban *et al.*, 1999).

Le stress salin est une contrainte qui mène aux changements des exopolysaccharides des rhizobies qui aident ces bactéries dans l'adaptation aux conditions de stress (Hung *et al.*, 2005). La tolérance à la salinité joue un rôle assez important dans la tolérance au pH et à la température (Tilak *et al.*, 2005).

La sélection de rhizobies pour une symbiose effective en milieu salin nécessite donc deux critères : la tolérance du rhizobium au sel et l'effectivité du rhizobium en présence de la plante hôte.



**Planche 8:** Effet du NaCl sur la croissance du groupes de souches testées



**Figure 16:** Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches testées.

### III-4-2- Température de croissance

La plupart des souches sont capables de croître à une température allant de 4°C (les isolats TB4 et TB10) jusqu'à 45°C (pour les isolats TB7, TB10, TF5) avec un optimum de croissance entre 25°C et 30°C, correspondant à celui indiqué pour les rhizobia par Jordan (1984). Plus de 45°C (50°C et 55°C), il n'y a aucune croissance (Tableau 7).

Ces résultats corroborent la grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de rhizobia. Pour la plupart des rhizobiums, l'intervalle de température de croissance est de 28 - 31 ° C, et beaucoup sont incapables de pousser à 37 ° C (Zahran, 1999)

Les souches telles que *Bradyrhizobium sp. Lupinus* ISLU 16 et *Sinorhizobium meliloti* GR4 sont capables de croître à des températures jusqu'à 40°C et *Azorhizobium caulinodans* 4398 également à 45°C (Diez *et al.*, 2009).

Il est à noter que l'augmentation du nombre de Rhizobium est d'autant plus important que la température d'incubation est plus élevée (18-28°C) (Cleyet-Marel et Crozat, 1982).

Beaucoup de Rhizobia de la plante *Prosopis cineraria* tolèrent des températures allant jusqu'à 55°C, et par exception d'autres isolats vivent dans une température de 65°C (Mahobia *et al.*, 2002). Pour la thermo-tolérance, elle est très variable parmi les espèces et les souches de rhizobia (Sebbane *et al.*, 2004).

Dans plusieurs organismes, l'apparition de thermotolérance a été corrélée avec la production des protéines hsp (heat shock proteins) (Michiels *et al.*, 1994). Des protéines de poids moléculaire entre 38 et 68 KDa jouent un rôle important dans la protection des organismes contre le stress thermique (Abou-Shanab, 2007).

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

**Tableau 7 : Température de croissance testée.**

	4°C	20°C	28°C	30°C	37°C	40°C	44°C	50°C
<b>TB1</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>TB4</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-	-
<b>TB7</b>	-	+	+	+	+	+	+(3j)	-
<b>TB10</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	+(3j)	-
<b>TF1</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>TF2</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>TF5</b>	-	+	+	+	+	+	+(3j)	-
<b>TM6</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>TM7</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>TM8</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>TM11</b>	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>HS1</b>	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>A6</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	+	-
<b>Hca1</b>	+(6j)	+	+	+	+	-	-	-
<b>HP7</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	+	+
<b>HnA</b>	+	+	+	+	+	+	+	-

### III-4-3- Tolérance au pH

Il ressort du test de l'effet du pH sur la croissance et le développement des isolats que la majorité des souches sont capable de pousser entre pH 4 et pH 10 avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant entre pH 6.5 et 7.5 (Planche 9) (Figure 17).

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Keyser et Munns (1979), Appunu et Dhar (2006) qui ont détecté la croissance de leurs souches a des conditions assez basses de l'acidité avec des valeurs de pH entre 4.5 et 6.3.

Aussi Küçük et Kivanç (2008) ont trouvé que les souches qui nodule la légumineuse *Cicer arietinum* L sont capable de vivre aux variations du pH de 3 à 9.

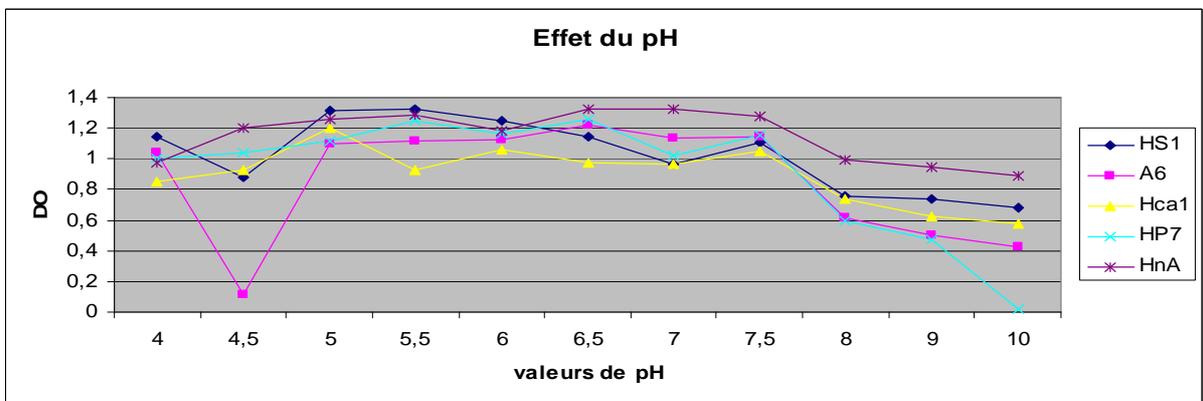
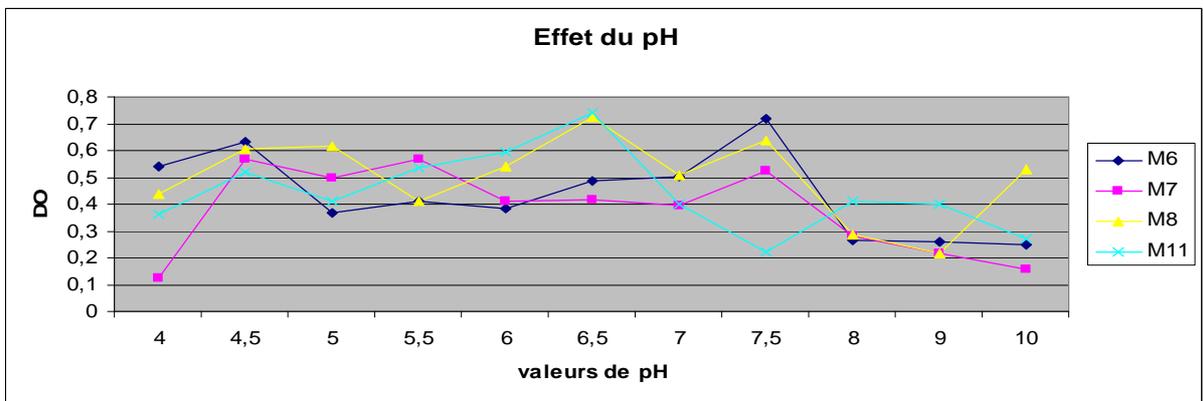
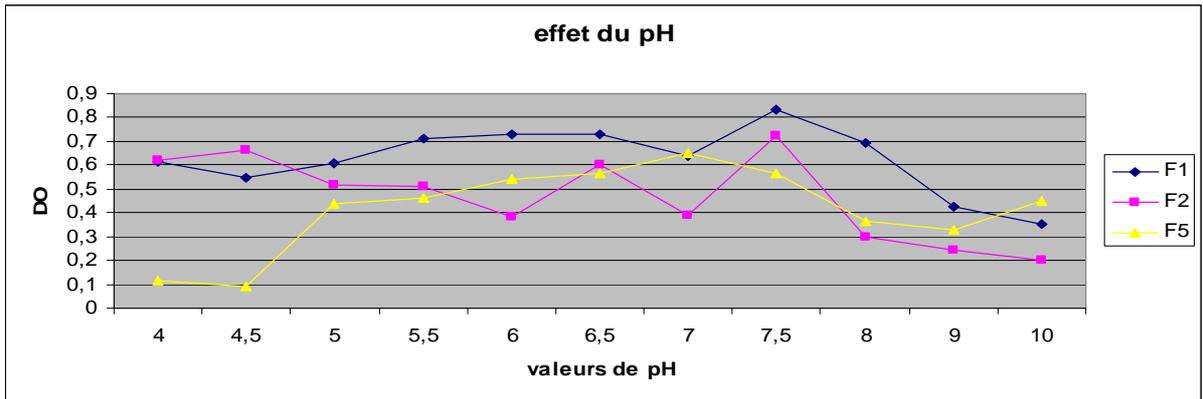
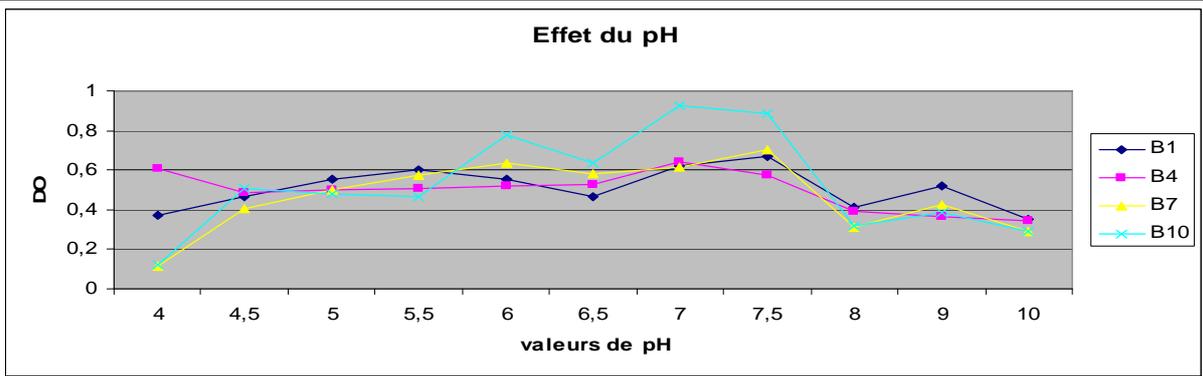
Selon Fujihara et Yoneyama, 1993 ; *Sinorhizobium fredii* pousse bien entre le pH de 4 à 9,5 mais *Bradyrhizobium japonicum*, ne peut pas pousser aux extrémités de cette gamme. Les même résultats sont obtenus par Ali *et al.*, (2009) avec des isolats de différentes légumineuses poussant dans la région semi-aride de Rajastthan, Inde.

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)

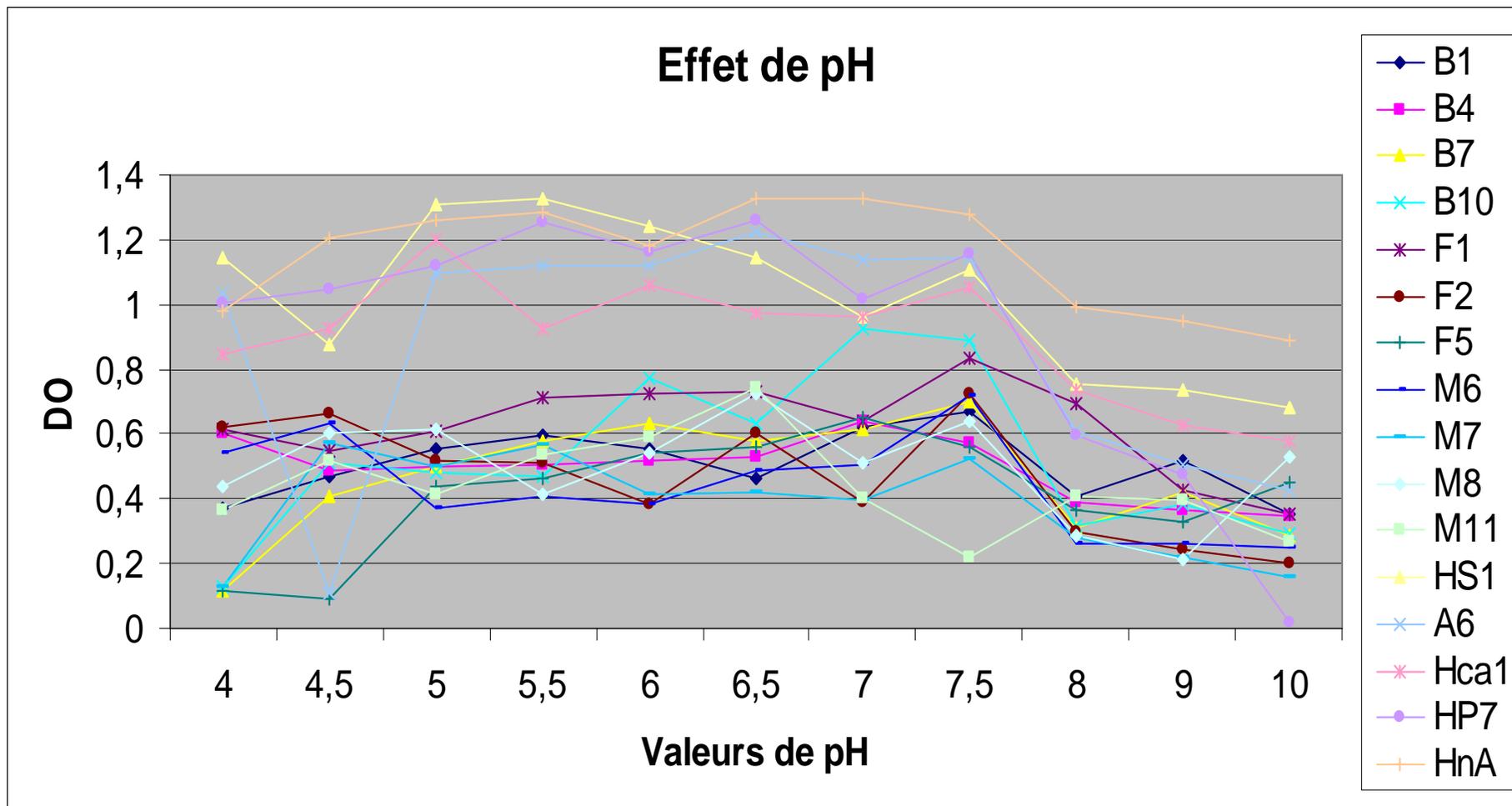
Il y a encore peu d'informations sur le plan biochimique et physiologiques sur la tolérance à l'acidité par des souches de *Rhizobium* (Correa et Barneix, 1997).

Les Rhizobiums adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acides du sol (Zahran, 1999).

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).



**Planche 9:** Effet du pH sur le groupe de souches testées



**Figure 17:** Effet du pH sur la croissance de toutes les souches testées.

### III-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

#### III-5-1-Résistance aux métaux lourds

Après incubation des souches sur TY en présence des métaux lourds la première remarque à signaler est que toutes les souches tolèrent les métaux lourds à des concentrations différentes.

Toutes les souches résistent à des concentrations très élevées d'antimoine ( $\text{SbO}_3$ ). Alors qu'elles montrent une nette sensibilité au chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) (Tableau 8).

Struffi *et al.*, 1998 ont montré la résistance du *Rhizobium sulae* au plomb et au cuivre, alors qu'elle présente une nette sensibilité au mercure.

De façon générale les effets toxiques des métaux lourds sur les microorganismes du sol dépendent de leur disponibilité biologique. Les microorganismes ont développés plusieurs mécanismes pour immobiliser, mobiliser ou transformer les effets des métaux lourds (Gremion, 2003).

Selon Giller *et al.*, (1998), l'effet des métaux lourds dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de métal utilisé. Kinkle et al (1994) ont rapporté aussi que les souches de *Sinorhizobium meliloti* ont des capacités élevées de tolérance aux divers métaux lourds (Pandyal *et al.*, 2007).

La productivité des récoltes et la nodulation des plantes, *Mucuna pruriens* et *Trigonella foenumgraecum* augmentées lorsque le  $\text{FeCl}_3$  est additionné de  $0\mu\text{M}$  à  $25\mu\text{M}$  mais plus de  $25\mu\text{M}$  l'effet négatif est enregistré (Pandyal *et al.*, 2007).

La contamination par le métal lourd peut avoir des effets significatifs sur les populations microbiennes indigènes. Par exemple, les métaux lourds peuvent réduire la composition en espèce et limiter la reproduction microbienne. Des métaux lourds ont été également identifiés pour leur activité antimicrobienne, telle que la fixation de l'azote chez les rhizobia (Wei *et al.*, 2009).

La sélection de souches résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs recherches se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre des rhizobia et des légumineuses résistantes comme un moyen efficace de "bio-remédiation" contre la contamination des sols par les métaux lourds. En outre, l'utilisation du rhizobium comme un agent de prévention dans les sols contaminés a été récemment rapportée par Abbes et Kamel (2004).

L'interaction des bactéries avec les métaux se produit sur une gamme de concentrations en métaux allant du nanomolaire ( $10^{-9}$ M) pour l'homoeostasie (métaux essentiels) au millimolaire ( $10^{-3}$ ) pour la résistance (toxicité pour ces mêmes métaux) et jusqu'au molaire pour certains chimiolithotrophes acidophiles (Monchy, 2007).

Par le processus évolutif, les microbes avaient amélioré leurs mécanismes de résistance au métal lourd pour s'adapter aux environnements défavorables. Les produits codés par les gènes résistants de métal lourd peuvent réduire ou éliminer la toxicité de métal lourd (Wei *et al.*, 2009).

Les micro-organismes doivent développer des mécanismes de résistance contrebalançant l'effet des hautes concentrations en métaux lourds tout en assurant le maintien du rôle biologique des ions essentiels (Monchy, 2007).

Des mécanismes de résistance aux métaux lourds tels que la biominéralisation, la séquestration, ou la conversion enzymatique diffèrent des véritables résistances aux métaux lourds qui sont eux liés à la présence de gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Ceux-ci portent des déterminants de résistance qui assurent l'extrusion des métaux (CDF «Cation Diffusion Facilitator», RND «Resistance-Nodulation-Cell Division », ATPases de type P) (Monchy, 2007).

- **Résistance au mercure :**

La résistance au mercure est la plus étudiée des résistances aux métaux lourds du monde bactérien. Les ions mercuriques sont extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines. Un mécanisme complexe de résistance, bien conservé chez les bactéries et codé en majorité par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles (Monchy, 2007).

### - **Résistance au plomb**

L'ion plomb (Pb(II)) est très toxique pour les systèmes biologiques et n'aurait pas de rôle dans le métabolisme des bactéries. De hauts niveaux de résistance au Pb(II) ont été décrits chez les bactéries Gram +, bien que les mécanismes génétiques de cette résistance restent inconnus (Monchy, 2007).

### **III-5-2- Résistance aux antibiotiques**

Les tests antibiotiques ont permis d'établir le spectre de résistance de chacune des souches.

La résistance intrinsèque aux antibiotiques révèle que toutes les souches sont sensibles aux Gentamycine, Kanamycine et Rifampicine. Par contre elles comportent différemment vis-à-vis des autres antibiotiques testés comme la streptomycine et la spectinomycine. En plus de ça nous avons remarqué que nos isolats sont plus sensibles aux antibiotiques que les souches de références et que la souche TF5 est la plus sensible parmi tous les isolats (Tableaux 9).

Les isolats à croissance Rapide et lente étaient différents les uns des autres en fonction de leur sensibilité aux différents antibiotiques (Pagano, 2008).

Ces isolats pourraient avoir développé une résistance aux antibiotiques à cause de la coexistence avec les organismes produisant des antibiotiques ou plasmides porteurs, qui portent des gènes pour la résistance des antibiotiques (Diriba, 2007).

Sur le plan biochimique, les bactéries ont développé quatre grands mécanismes d'acquisition de la résistance:

- i) la modification de la cible, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière.
- ii) la production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique.
- iii) l'imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) chez les bacilles à Gram négatif.
- iv) l'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes.

Le motif commun à ces différents mécanismes de résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible (Courvalin, 2008).

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes. Soit des mutations dans le génome, on parlera alors de transmission verticale à la descendance, soit l'acquisition d'information génétique étrangère, en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal (Courvalin, 2008).

**Tableau 8:** Concentration minimale inhibitrices (CMI) de différents métaux lourds

	<b>HgCl<sub>2</sub></b>	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>CuCl<sub>2</sub></b>	<b>Pb(CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)<sub>2</sub></b>	<b>SbO<sub>3</sub></b>
<b>TB1</b>	400	1400	1600	1500	>8000
<b>TB4</b>	200	900	800	1500	>8000
<b>TB7</b>	100	1400	1250	1500	>8000
<b>TB10</b>	100	900	900	1800	>8000
<b>TF1</b>	100	800	1270	1500	8000
<b>TF2</b>	100	800	750	1500	8000
<b>TF5</b>	100	900	1250	1700	>6000
<b>TM6</b>	100	800	750	1500	>8000
<b>TM7</b>	100	800	750	1500	5000
<b>TM8</b>	100	800	750	1500	5000
<b>TM11</b>	100	800	750	1500	6000
<b>HS1</b>	250	2750	1500	2250	>6000
<b>A6</b>	500	2750	1500	2250	>6000
<b>Hca1</b>	250	2250	1500	2250	>6000
<b>HP7</b>	250	2500	1500	2250	>6000
<b>HnA</b>	750	2750	1500	2250	>6000

**Tableau 9:** Concentration minimale inhibitrices (CMI) de différents antibiotiques

	<b>Rif</b>	<b>Spec</b>	<b>Gent</b>	<b>Ery</b>	<b>Strep</b>	<b>Kana</b>	<b>Chloram</b>
<b>TB1</b>	100	1800	60	100	800	100	200
<b>TB4</b>	100	800	60	150	800	100	50
<b>TB7</b>	100	750	60	400	750	75	150
<b>TB10</b>	50	1800	60	150	750	50	50
<b>TF1</b>	100	1800	60	100	800	100	50
<b>TF2</b>	50	750	500	200	800	50	150
<b>TF5</b>	50	750	25	50	750	50	50
<b>TM6</b>	50	750	500	200	750	50	150
<b>TM7</b>	50	750	500	200	600	50	300
<b>TM8</b>	50	750	500	200	600	50	300
<b>TM11</b>	50	750	500	200	600	50	300
<b>HS1</b>	200	>5000	300	>5000	500	20	100
<b>A6</b>	200	>5000	1250	>5000	1250	600	500
<b>Hca1</b>	100	>5000	400	>5000	400	20	100
<b>HP7</b>	50	>5000	300	>5000	600	300	100
<b>HnA</b>	50	>5000	100	>5000	400	20	300

### III-6- La sensibilité aux phages

Après isolement des phages, et leur analyse en contacte avec une culture bactérienne fraîche toutes les souches présentent un résultat négatif, c'est-à-dire aucune zone de lyse ou zone d'inhibition de croissance n'a été observé. Cela suggère que soit : on n'a pas pu isoler des phages à partir du sol, soit l'échantillon du sol choisi est dépourvu de rhizobiophages spécifiques à nos souches ou bien nos souches ont développé une résistance contre les rhizobiophages.

Puisque, les interactions entre les rhizobiophages et leurs hôtes sont hautement spécifiques, ils peuvent être des outils valables dans les recherches écologiques avec les rhizobia (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le rôle principal des rhizobiophages est de contrôler la population du rhizobia dans différents sols. Des bactériophages peuvent être utilisés pour l'identification et la différenciation des souches bactériennes (Mehdipour-Moghaddam *et al.*, 2008).

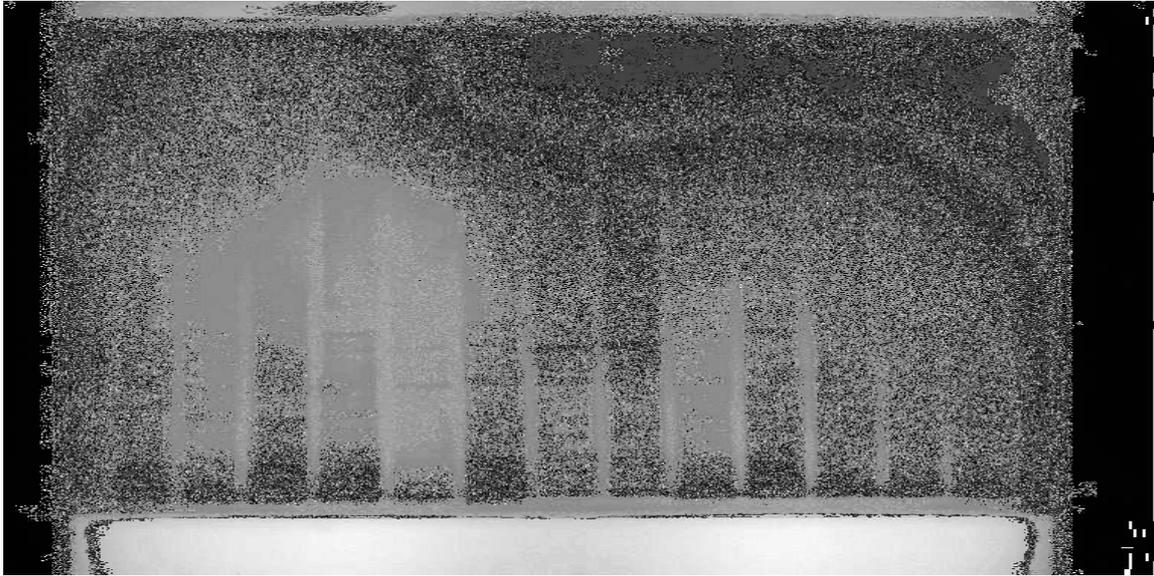
D'après de Lajudie et al (1984) des bactériophages ont été isolés dans la plupart des espèces de rhizobium: *R. Lupini*, *R. trifolii* et *R. leguminosarum*.

Deux rhizobiophages, RS1 et RS2, ont été isolés au Sénégal d'un échantillon de sol et de nodules de tiges séchées de *Sesbania rostrata*, une légumineuse tropicale qui est infectée par deux catégories de souches de *Rhizobium*: les "souches de tige" qui causent la nodulation à la fois des racines et des tiges (souche type, ORS57 1) et les "souches de racine" qui n'induisent efficacement des nodules que chez les racines. Les deux phages se sont avérés avoir une gamme d'hôtes restreinte à l'ORS571; toutes les souches de racine se sont révélées résistantes (de Lajudie *et al.*, 1984).

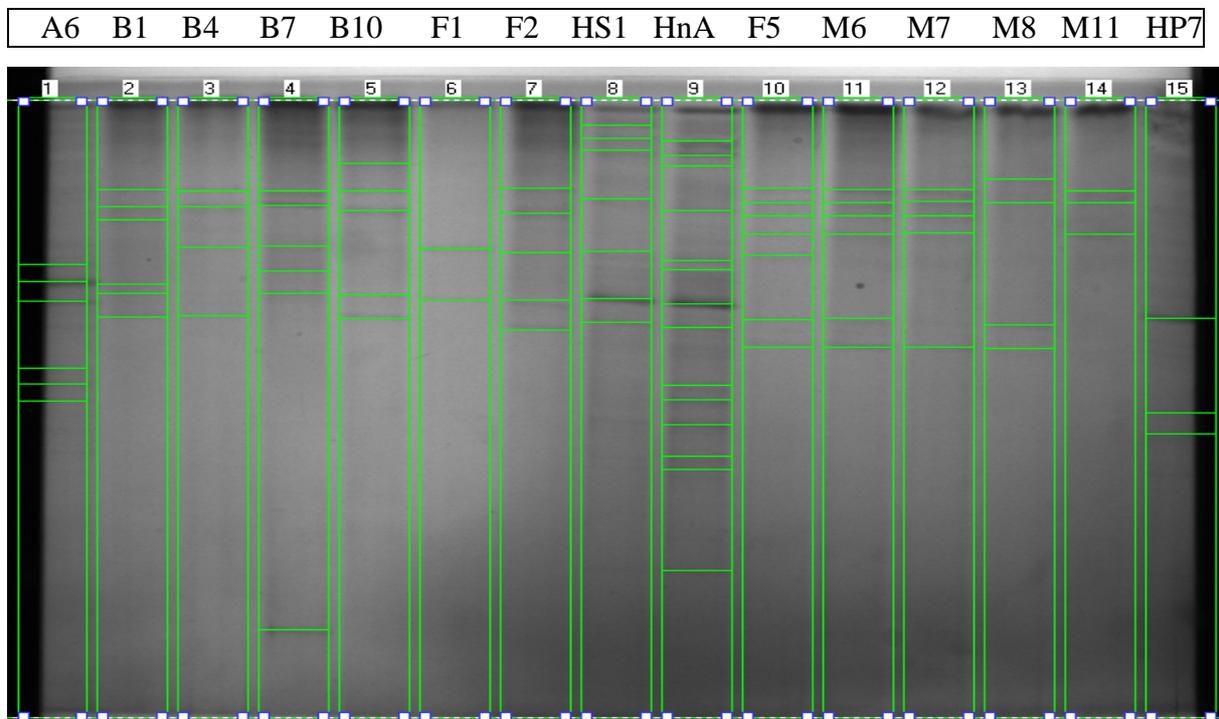
Tous les bactériophages ont une tête polyhedral avec des queues longues et contractiles ou très courtes et non contractiles, ces phages classés en 5 types morphologiques (basés sur la morphologie de viron) et regroupés en 3 familles bactériophagiques incluant Myoviridae (groupe A), Siphoviridae (groupe B) et Podoviridae (groupe C) (Mehdipour-Moghaddam *et al.*, 2008).

#### IV- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

L'analyse du profil protéique des bactéries est effectuée grâce au logiciel **PhotoCapt** (Vilber Lourmat), qui nous a permis de lire nos bandes électrophorétiques et donc pouvoir faire une comparaison deux à deux.



**Figure 18** : profils protéiques des différentes souches



**Figure 19** : Détermination des bandes électrophorétiques (logiciel PhotoCapt).

L'évaluation de la similarité des souches est obtenue en calculant un coefficient de similitude qui permet de déterminer le degré de ressemblance entre les profils protéiques des différentes souches. Ce coefficient est calculé par comparaison de la mobilité relative des bandes des souches prises deux à deux.

$$Cs = [Ns / (Ns + Nd)] \times 100$$

Avec: -Ns : nombre de bande qui ont mobilités relatives similaires.

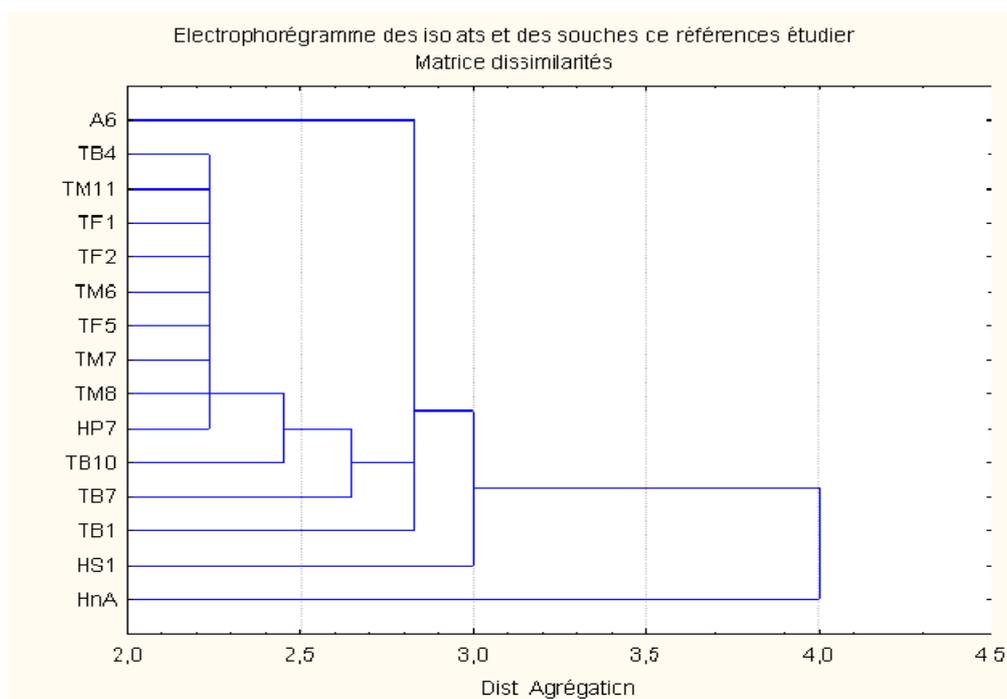
-Nd : nombre de bande qui ont mobilités relatives différentes.

**Tableau 10** : Coefficient de similitude entre les isolats et les souches témoins

	TB1	TB4	TB7	TB10	TF1	TF2	TF5	TM6	TM7	TM8	TM11
A6	80.64	83.87	80.64	82.25	87.09	82.25	79.03	80.64	82.25	83.87	85.48
HS1	79.03	82.25	79.03	80.64	85.48	80.64	77.41	79.03	80.64	82.25	83.87
HnA	67.74	70.96	67.74	72.58	74.19	74.19	66.12	67.74	69.35	70.96	72.58
HP7	85.48	88.70	85.48	90.32	91.93	87.09	83.87	72.58	83.87	88.70	87.09

#### Etablissement d'électrophorégramme :

Un électrophorégramme est créé par le logiciel **STATISTICA 6**, après le calcul de la distance de migration de chaque bande protéique (figure 19).



**Figure 19** : Electrophorégramme des souches testées.

Les résultats obtenus montre que les isolats donnent un degré de similitude élevé avec toutes les souches de références. En plus de ça l'électrophorégramme présente une classification de nos isolats par apport aux souches de références en deux grands closters G1 : A6, TB4, TM11,TF1, TF2, TM6, TF5, TM7, TM8, HP7, TB10, TB7, TB1, HS1 incluant un deuxième closter G2 : TB4, TM11,TF1, TF2, TM6, TF5, TM7, TM8, HP7. Révétons ainsi l'appartenance des isolats au groupes des rhizobia.

## Conclusion générale

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

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des populations naturelles des bactéries symbiotiques nodulant les trois populations de *Trigonella* L récoltées à l'Est algérien. Cette recherche a permis de déceler d'une part les différentes caractéristiques d'intérêt fonctionnel des souches et leur diversité. Or, jusqu'à nos jours, aucune étude précise n'a été menée pour étudier la variabilité des bactéries symbiotiques de Fenugrec en Algérie.

A cet effet, des prospections et collecte de plantes nodulées appartenant à différentes populations de Fenugrec ont été menées. Une collection de 11 isolats issus des nodosités fraîches a été construite. Ces isolats ont été authentifiés par inoculation des plantules de *Trigonella* cultivées dans des jarres contenant du sable et de la vermiculite. Les résultats analysés après deux à trois mois de culture se sont révélés tous positifs et ceci indépendamment de l'espèce d'origine des isolats.

Les 11 souches ont présenté une bonne affinité infective avec la plante hôte utilisée curieusement, toutes les souches ont présenté un taux de croissance rapide. L'utilisation des différents substrats carbonés a montré également un profil d'assimilation très similaire à celui des souches à croissance rapide.

Disposer d'une bonne collection de souches nodulant le Fénugrec est essentiel pour la création de symbioses complémentaires et efficaces. Les souches indigènes sont plus compétitives et plus adaptées pour survivre sous les contraintes édaphiques locales (salinité, acidité, alcalinité, température, etc.) en l'absence de la plante hôte.

Ainsi, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis des principaux facteurs de stress, en l'occurrence la salinité et principalement le NaCl, le pH et les températures extrêmes. L'osmotolérance s'est révélée très importante pouvant aller jusqu'à 1710mM de NaCl. Les souches sont capables également de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 4,5 à 9,5. Quant à la température, la tolérance totale s'étend de 4°C à 50°C.

Dans le sol, la salinité et les variations du pH sont accompagnées généralement par une toxicité minérale. Nous avons donc apprécié le degré de l'inhibition de la croissance des souches par cinq différents métaux sous formes de chlorure. L'inhibition s'est révélée plus importante selon l'ordre suivant :  $\text{HgCl}_2 > \text{ZnCl}_2 > \text{CuCl}_2 > \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO}^-)_2 > \text{SbO}_3$ . La résistance des souches aux sept différents antibiotiques testés a indiqué une grande résistance à l'érythromycine, à la Spectinomycine et à la Streptomycine contre une sensibilité bien marquée à la Rifampicine, Gentamycine et Kanamycine.

La SDS-PAGE est réalisée pour déterminer le profil des protéines totales des souches. Les coefficients de similitude des bandes polypeptidiques entre les isolats et les souches témoins confirmés l'appartenance de nos isolats au groupes des rhizobia.

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.
- l'exploitation de la grande résistance des souches aux métaux lourds.
- l'établissement de stratégies d'amélioration efficace de la symbiose par la production d'inoculum de bonne qualité, c'est-à-dire l'étude de l'aptitude des souches sélectionnées à survivre et à maintenir leur potentiel symbiotique durant le stockage de l'inoculum, pendant l'inoculation au champ et durant les années suivantes (besoin de réinoculation).

Sur le plan écophysiologique et moléculaire, on peut citer :

- l'élucidation des mécanismes d'infection et des déterminants génétiques impliqués dans la formation de l'amas nodulaire.
- la détermination du statut taxonomique des souches de *Trigonella* L étudiées et d'autres espèces endémiques algérienne 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.

# References Bibliographiques

**Abbas S.M., Kamel E.A., 2004:** *Rhizobium* as a Biological Agent for Preventing Heavy Metal Stress. Asian Journal of Plant Sciences 3 (4) pp 416-424

**Abou-Shanab Reda A.I., 2007:** Characterization and 16S rDNA Identification of Thermo-tolerant Bacteria Isolated from Hot Springs. Journal of Applied Sciences Research, 3(10) pp 994-1000.

**Adriana Aranda Rickert, Marcelo Abel Soria and Olga Susana Correa., 2000:** The adaptive acid response in *Mesorhizobium sp.* World Journal of Microbiology & Biotechnology 16 pp 475-480.

**Ali S. F., Rawat L. S., Meghvansi M. K. and Mahna S. K., 2009:** Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry region of Rajasthan, India. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. Vol 4, N°1

**Allen E. K., and Allen O.N., 1950:** Biochemical and Physiological properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* 14 pp 173-330.

**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

**Baldani J. I. and Baldani V. L. D., 2005:** History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Brass. Sci.* 77: pp 549- 579.

**Baldwin, I. L., Fred E. B., 1929:** Nomenclature of the root nodule bacteria of the leguminosae. *J. Bacteriol.* 17, pp 141-150.

**Barbier-Brygoo., 1996 :** Communication cellulaire et transduction de signaux chez les végétaux supérieurs. *Medicine/Sciences N° spécial.* pp 137-142

**Baudoin J.P., 2001 :** Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 5 (4) pp 221–230

**Beatriz Ruiz-Díez. Susana Fajardo. Miguel Angel Puertas-Mejía. María del Rosario de Felipe. Mercedes Fernández-Pascual., 2009:** Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol* (2009) 191 pp35–46.

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

- 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.
- Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A., Squartini A., 2004:** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System Appl Microbial*. 27 pp 462-468.
- Beringer J.E., 1974:** R-Factor transfer in rhizobium legume. *J. Gen. Microbiol.* 84 pp 188-198.
- Bernaerts J.E., De Ley J., 1963:** A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* N°199 pp 406-407.
- Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L., 2006 :** Détection et typage du gène *nod C* à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG*, 6 pp 97-110
- Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe G., Carrere S., Talini L., Boivin-Masson C., 2005:** Microarray-Based Detection and Typing of the Rhizobium Nodulation Gene *nodC*: Potential of DNA Arrays To Diagnose Biological Functions of Interest. *Applied and Environmental Microbiology*, pp 8042–8048.
- Boukli N.M., Sunderasan E., Bartsev A., Hochstrasser D., Perret X., Bjourson A.J., Krause A., Broughton W.J., 2006:** Early legume responses to inoculation with *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of plant physiology*. pp 1-13.
- Brabban A.D., Orcutt E.N., Zinder S.H., 1999:** Interactions between Nitrogen Fixation and Osmoregulation in the Methanogenic Archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *Applied and Environmental Microbiology* Vol 65 N°3. pp 1222-1227.
- Brewin N J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992:** Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York 3 pp 239-248.
- Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X., 2000:** Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology* 182 (20) pp 5641-56525.
- Burnie G., Forrester S., Greig D., Guest S., Harmony M., Hobley S. et al., 2006:** *Botanica Encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Edition Place des Victoires. Paris. France.
- Campbell, J. McA. and Reid, J.S.G., 1982:** Galactomannan formation and guanosine 5'-diphosphatemannose: galactomannan mannosyltransferase in developing seeds of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L., Leguminosae). *Planta*, 155 pp 105–11.
- Chataigné G., 2007 :** Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de Doctorat de L'Université de Toulouse III. France.

- Claudiel-Renard C., 2003 :** Inférence fonctionnelle et prédiction de voies métaboliques. Application à la bactérie fixatrice d'azote *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier Toulouse III. France.
- Cleyet-Marel J.C., Crozat Y., 1982:** Etude écologique en immunofluorescence de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère. Revue d'agronomie N° 3-82 243-248
- Come D., Francoise C., 2006 :** Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes, Edition Tec et Doc. Lavoisier.
- Coronado C, Zuanazzi J, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A et Ratet P 1995 :** Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. Plant Physiol. 108 pp 533-542.
- Correa O.S., Barneix A.J., 1997:** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 13 pp 153-157
- Couvalin P., 2007 :** La résistance des bactéries aux antibiotiques : Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Bull. Acad. Vét. France 2008 Tome 161 - N°1 pp 7-12.
- Crossman L.C., 2004 :** Plasmid replicons of *Rhizobium*. Biochemical Society Transactions Volume 33, part 1.p : 157-158.
- Cullimore, J. V., Ranjeva R., Bono J. J., 2001 :** Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. Trends Plant Sci 6:24- 30.
- Davet P., 1996 :** Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris. France. pp 145-161.
- Davidson I. A., Robson M. J., 1986:** Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N<sub>2</sub>-fixation, nodulation and growth of white clover. *Ann. Bot.* 57 pp 331-338.
- Dazzo F. B., Holt J.G., Garchow H., Klug M., Pankratz H.S., Baker D., Rarick M., Rundquist J., Soeth E., Trinh A., 1993:** Value of morphological analyses to evaluate the diversity of soil bacteria. In: H Collin (ed). The functional significance and regulation of soil biodiversity. Soil Ecology Society, Plants & soil, Special Volume.
- de Lajudie P., Bogusz., 1984 :** Isolation and characterization of two bacteriophages of a stem-nodulating *Rhizobium* strain from *Sesbania rostrata*. CAN.J. Microbiol. Vol 30
- de Lajudie P., Laurent-Fulel E., Willems A., Toreck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B., Gillis M., 1998:** *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. Nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 48 pp 1277-1290.
- Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C., 2001:** nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. Acta Biochimica Polonica Minireview. 48 (2) pp 359-365.

- Debellé F., Rosenberg C., Bono J.J., 2007:** Calcium et signalisation Nod. M/S N° 2, Vol. 23, pp 130-132.
- Denarie J., 2000 :** Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- Desperrier N., Baccou J.C., Sauvaire Y., 1986:** Fixation de l'azote atmosphérique et assimilation du nitrate chez le fenugrec (*Trigonella foenum graecum* L.) cultivé au champ. Plant and Soil 92, pp 189-199.
- Diriba T., 2007:** Nodulation Pattern and Biodiversity of Endosymbionts of Some Woody Legumes of Ethiopia. Thèse de Master en science de biologie de l'université d'Addis Ababa.
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G., 1999 :** Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Edition espaces 34 (CIRAD, FAO, IRD).
- Doyle, J.J., 1998:** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends in Plant Science, 3 (12): 473-478.
- Duhoux E., Nicole M., 2004 :** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. pp 1-20 Edition DUNOD. Paris. France.
- Duke, A.J., 1986:** Handbook of Legumes of World Economic Importance, Plenum Press, New York and London.
- Dupux Yves., Nougier P., 2005 :** Les micro-organismes du gène à la biosphère Edition ellipses France.
- 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.
- Elsiddig A E, Elsheikh, 1998:** Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review Ann. appl. Biol. (1998), 132 pp 507-524 Printed in Great Britain.
- Fähreus A., 1957:** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. 16 pp 354-381.
- Fazli, F.R.Y. and Hardman, R., 1968:** The spice fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Its commercial varieties of seed as a source of diosgenin. *Trop. Sci.*, **10** pp 66-78.
- Frank, B., 1879:** Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung.* **24** pp 377-388.
- Frank, B., 1889:** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **7** pp 332-346.
- Fred, E. B., Baldwin I. L., McCoy E., 1932:** Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis.

- Fujihara S., Yoneyama T., 1993:** Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59, No. 4 pp 1104-1109.
- Giles E.D., Oldroyd., Dawnin J.A., 2004 :** Calcium, Kinas and nodulation signalling in legume. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5 pp 566-576.
- Gloux K., Le Rudulier D., 1989:** Transport and catabolisme of proline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol.N°151 pp 143-148.
- Graham, P. H., Sadowsky M. J., Kersters H. H., Barnet Y. M., Bradley R. S., Cooper J. E., De Ley D. J., Jarvis B. D. W., Roslycky E. B., Strijdom B. W., Young J. P. W., 1991:** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 pp 582-587.
- Gremion F., 2003:** Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods. These de Doctorat en sciences de l'Université de Neuchâtel, Lausanne, EPFL
- Guignard J.L, Dupont F., 2004 :** Botanique : systématique moléculaire. 13<sup>ème</sup> Edition, Masson. Paris. France pp 164-179.
- Guignard J.L., 2000 :** Biochimie végétale. 2<sup>e</sup> édition. Edition Dunod. Paris France.
- Guiraud J.P., 1998:** Microbiologie alimentaire.DUNOD. Paris.
- Hofer A.V., 1941:** A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and Van Delden). J. Bacteriol.N°41 (2) pp 193-224.
- Hopkins W.G., 2003:** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119.
- Howard, M., 1987:** Traditional Folk Remedies, A Comprehensive Herbal, Century Hutchinson Ltd., London.
- Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P., Young C.C., 2005:** Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. Pedobiologia 49 pp 577-584.
- Idrissi L., 2006 :** Etude et developpement de nouvelles methodes electrochimiques pour la determination des ions orthophosphate, nitrite, nitrate et ammonium. thèse de doctorat d'état de l'université Mohammed V Agdal. Maroc.
- Joffin J-N., Leyval Guy., 2006:** Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4<sup>e</sup> edition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.
- Jordan D.C., 1984 :** Rhizobiaceae. In N. R.Krieg and J.G.Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. the Williams & Wilkins, Co., Baltimore. pp 234-245.

- Jordan, D.C., 1982:** Transfer of *rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, Int. J. Syst. Bacteriol. 32 pp 136-139.
- José M., Igual1., Velázquez E.,Mateos P F;Rodriguez-Barrueco1 C., Cervantes1 E., Martinez-Molina E., 2001 :** Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups.
- Kambara K., 2008:** Regulation and Effects of the Type-three Secretion System of *Rhizobium* species NGR234.Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université de Geneve.
- Kape R., Parniske M., Werner D., 1991:** Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. Appl Environ Microbiol. 57 pp 316-319.
- Karunakaran R., Ebert K., Harvey S., Leonard M. E., Ramachandran V., Poole P. S., 2006:** Thiamine Is Synthesized by a Salvage Pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae Strain 3841.Journal of Bacteriology Vol 188. N°18, pp 6661–6668.
- Keyser.H.H.,Munns. DN., Hohenberg J.S 1979:** Acid Tolerance of Rhizobia in Culture and in Symbiosis with Cowpea. SOIL SCI. SOC. AM. J., VOL. 43 pp .42-52.
- Kondorosi E., Kondorosi A., 2000:** Control of root nodule organogenesis. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK
- Küçük Ç., Kivanç M., 2008:** Preliminary characterization of *Rhizobium* strains isolated from chickpea nodules African Journal of Biotechnology Vol. 7 (6), pp. 772-775.
- Laemmli U.K., 1970:** Cleavage of structural proteins during the qsembly of the head of bacteriophage T4. Nature N°227 pp 680-685.
- Lefevre C., 2004 :** Caractérisation et phylogénie des bactéries symbiotiques intracellulaires des charançons de la famille des Dryophthoridae. Thèse de Doctorat de l'Institut national des sciences appliquées de Lyon. France.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-allemant C., 2005 :** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Edition Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. pp 67-70.
- Madigan M., Martink J., 2007 :** Brock Biologie des microorganismes 11<sup>e</sup> edition. Edition Person Education France. pp 599-601, 676-681.
- Mahobia Vertica., Mahna Suresh K., 2002:** Characterization of Rhizobia Isolated from *Prosopis cineraria* in Jodhpur Region, Rajasthan, India. Improvement and Culture of Nitrogen Fixing Trees. Vol 5 N° 1 pp 3-5

- Maidak, B. L., Larsen N., McCaughey M. J., Overbeek R., Olsen G. J., Foge K., Blandy J., and Woese C. R., 1994:** The ribosomal database project. *Nucleic Acid Res.* **22** pp 3485-3487.
- Maletić R., Jevdžović R., 2007:** Sowing date – the factor of yield and quality of Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum L.*). *Journal of Agricultural Sciences* Vol. 52, No 1 pp 1-8
- Mateos P.F., Jose I., Jimenez-zurdo, Jin Chen., Squartini A., Haack S.K., Martinez-molina S., Hubbell D.H., Dazzo F.B., 1992:** Cell-Associated Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar Trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 58 N°6, pp 1816-1822
- Mehdipour-Moghaddam M., Bouzari M., Emtiazi G., 2008:** Isolation and Identification of Rhizobium Bacteriophages in Guilan and Isfahan Provinces, Iran. *Research Journal of Biological Sciences* 3(9) pp 1097-1101.
- Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., 2004:** Botanique: Biologie et physiologie végétales. Edition Maloine Paris France pp 216-219.
- Miklashevichs, E., Rohrig H., Schell J., Schmidt J., 2001:** Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20 pp 373-394.
- Monchy S., 2007 :** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de doctorat de l'Université Libre de Bruxelles.
- Moulin L., 2002 :** Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène nod A à l'identification de rhizobia au sein des bêta-Protéobactéries. Thèse de Doctorat en Sciences Biologie. Université Claude Bernard Lyon I. France. p 289.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C. 2001 :** Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -sb class of Proteobacteria. *Nature* N° 411 pp 948-950.
- N'zoué, A., Domergue, O., Moulin, L., Avarre, J.-C. and de Lajudie P., 2006 :** Tropical Legume Nodulating Bacteria. *Molecular Biology of Tropical Plants*. pp 105-141
- Pagano M.C., 2008:** Rhizobia associated with neotropical tree *Centropogon tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, 2008 (11) pp 498–508
- Paudyal, Aryal R., Chauhan S.V.S., Maheshwari D.K., 2007:** Effect of heavy metals on growth of Rhizobium strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. *Scientific World*, Vol. 5, N°5, pp 27-32.
- Pawlowski K., et Bisseling T., 1996:** rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell* 8 pp 1899-1913.
- Pelmont J., 1995:** bactérie et environnement adaptation physiologique. Edition Office des Publications Universitaires. Vol 2.

- Peret Benjamin., 2007 :** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II. France.
- Perry J.J., Stalex J.T., Lory S., 2004:** Microbiologie cours et questions de revision. Edition DUNOD. Paris. France.
- Petropoulos G.A., 2002:** Fenugreek. The genus *Trigonella*. Edition Taylor & Francis New York. Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 63, N° 4 pp 968–989
- Pujic P., Normand P., 2009 :** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. Biofuture 298 pp 26-29.
- Quezel P., Santa S., 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France.
- Rathore M.S., Shekhawat N.S., Gehlot H.S., 2009:** Need of Assessing Rhizobia for Their Plant Growth Promoting Activities Associated with Native Wild Legumes Inhabiting Aravalli Ranges of Rajasthan, India. Botany Research International 2 (2) pp 115-122
- Raven., Evert., Eichhorn., 2007 :** Biologie végétale. 2<sup>e</sup> édition. Edition de boeck. Paris France. pp 653-660.
- Räsänen L.A., 2002:** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.
- Reid, J.S.G. and Bewley, J.D., 1979:** A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic leguminous seed. *Planta*, 147 pp 145–50.
- Richter G., 1993 :** Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp 341-352.
- Rickert A.A., Marcelo A.S., Olga S.C., 2000:** The adaptive acid response in *Mesorhizobium* sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16 pp 475-480.
- Roger P., 1996:** La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement ? Conférence débat de l'ORSTOM. Paris X<sup>e</sup> France.
- Rosengarten, F., 1969:** The Book of Spices, Livingston, Wynnewood, Penns., USA.
- Rouk, H.F. and Mangesha, H., 1963:** Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Its relationship, geography and economic importance, Exper. Stat. Bull. No. 20, Imper. Ethiopian College of Agric. & Mech. Arts.
- Ruiz-Díez B., Fajardo S., Puertas-Mejía M.A., del Rosario de Felipe M., Fernández-Pascual M., 2009:** Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-

nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. Arch Microbiol 191pp 35–46

**Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S., 2002:** Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. Mol Plant Microbe Interact. 15: 866-874.

**Schauenberg, P. and Paris, F., 1990:** Guide to Medicinal Plants, Lutterworth Press, Cambridge, UK

**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.

**Sebbane N., Boulila A., Sahnoune M., Ramdani N., de Lajudie P., Benallaoua S., 2004 :** Caractérisation phénotypique de souches de rhizobia isolées de quatre espèces de *Medicago* dans la vallée de la Soummam (Algérie). Sciences & Technologie C N°21 pp 5-10.

**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.

**Sinskaya, E., 1961:** Flora of cultivated plants of the U.S.S.R. XIII. Perennial leguminous plants, Part I. Medic,

**Somasegaran P., Hoben H.J., 1985:** Methods in legumes-rhizobium technology. pp1-331. Niftal. University of Hawaii.

**Somasegaran P., Hoben H.J., 1994:** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .pp 450.

**Spyropoulos, C.G. and Reid, J.S.G., 1985:** Regulation of  $\alpha$ -galactosidase activity and the hydrolysis of galactomannan in the endosperm of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed. *Planta*, 166 pp 271–5.

**Squartini A., Struffi P., Doring H., Pobell S.S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P.F., Molina E.M., Dazzo F.B., Casella S., Nuti M.P., 2002:** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly 'rhizobium hedysari'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52, pp 1267-1276.

**Stowers M. D., 1985:** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, pp 89-108.

**Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P., 1998:** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology. 84(1) pp 81-89. supporting bacteria Current Science, Vol. 89, N°1.

**Stuart, M., 1986:** The Encyclopaedia of Herbs and Herbalism, Orbis, London

- Svistoonoff S., 2003 :** Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II. France.
- Terefework Z., 2002 :** Diversity and phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki. ISSN pp 1239-9469.
- Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., De R., Saxena A. K., Shekhar Nautiyal C., Shilpi Mittal, Tripathi A. K., Johri B. N., 2005:** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, Vol. 89, N° 1. pp 136-150.
- Torche A., 2006:** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.
- Tortora G.J., Funk B.R., Case C.L., 2003:** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. pp 826-830.
- Tourte Y., Bordonean M., Henry M., 2005:** Le monde des végétaux organisatio, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France.
- Vandamme P. B., Grillis P. D. V., Kersters K., Swing J, 1996:** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60 pp 407- 438.
- Vandamme, P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., and Swings J., 1996:** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60 pp 407-438.
- Vasse, J., de Billy F., Camut S., Truchet G., 1990:** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172 pp 4295-306.
- Vincent J.M., 1970:** The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.
- Wajcman 2002 :** L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme : un motif structural unique, des fonctions multiples. Edition Scientifiques et médicales Elsevier SAS. pp 1159-1174.
- Waligora Cecile., Tetu T., 2008 :** Legumineuses il est urgent de les réhabiliter. Edition Techniques culturelles simplifiées. N° 48 Juin/Juillet/Août 2008.
- Wei G., Fan L., Zhu W., Fu Y., Yu J., Tang M., 2009 :** Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials* 162 pp 50–56.
- Werner D., 1992:** symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.
- Wilson, J. K. 1944:** Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* 58 pp 61-69.

**Woese C. R., 1987:** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 512 pp 221-71.

**Young, J. P. W., Downer H. L, Eardly B. D., 1991:** Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bact.* 173 pp 2271- 2277.

**Zahran H. H., 1999:** *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 63, N° 4 pp 968–989

**Zakhia F., de Lajudie P., 2006 :** La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* N° 52 p : 169-181.

**Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P., 2004:** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* pp 380-395.

# Annexe

## Annexe 1 :

### Milieux de culture et solutions utilisés

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

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

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

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

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

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

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

#### Composition de milieu YMA + 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 (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

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

**Composition de la solution nutritive en g/l (Fahreus, 1957)**

CaCl <sub>2</sub>	0.10
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.15
Citrate de fer	0.005
Micro éléments	1ml

**Solution micro éléments g/l**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	2.03
ZnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.14
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

**Composition de milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l (Beringer, 1974)**

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0.87
Eau distillée	1000ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

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

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub>	0.21
CaCl <sub>2</sub>	0.21
Glutamate-Na	1
Mannitol	1
Solution stock vitamines	1ml
Oligoéléments	1ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

**Solution stock vitamines (mg/l)**

Acide nicotinique	100
Thiamine	100
Panhotenate-Ca	100

Dissoudre dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M ; pH 7.

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.22µm).

**Solution oligoéléments (mg/l)**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	35
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	8
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	40
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

### Composition de milieu B III en g/l (Dazzo, 1982)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.23
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.10
Glutamate-Na	1.10
Solution stock vitamines	1ml
Solution stock oligoéléments	1ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

#### Solution stock vitamines (mg/l)

Riboflavine	20
Acide p-aminobenzoïque	20
Acide nicotinique	20
Biotine	20
Thiamine-HCl	20
Pyridoxine-HCl	20
Panhotenate-Ca	20
Inositol	20

Dissoudre dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M ; pH 7

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.22µm).

#### Solution oligoéléments (mg/l)

CaCl <sub>2</sub>	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.145
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.125
CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.070
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.005
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.0043
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.108
NaMoO <sub>4</sub>	0.125
Nitril triacetate	1

Ce dernier n'est rajouté qu'après avoir ajusté la pH à 5.0 évitant ainsi une précipitation.

La stérilisation de la solution des oligoéléments est effectuée par autoclavage.

### Composition de milieu lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989).

#### Solution A (g/l)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
NaHPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.05
Eau distillée	1000ml

#### Solution B (mg/l)

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	10
ZnSO <sub>4</sub>	1
CuSO <sub>4</sub>	1
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.5
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1
Eau distillée	1000ml

Biotine	2g
Acide aspatique	100mg
Acide lactique	0.74mg
Eau distillée	1000ml

Préparation de milieu :

- Prendre 100ml de la solution A.
- Mélanger avec 20ml de la solution B ensuite compléter à 1000ml.
- Additionner l'acide lactique et l'acide aspartique.
- Ajuster le pH à 7.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu.

On ajoute dans chaque cas la concentration sélectionnée de NaCl.

### **Composition de milieu MNB/MNA (Mannitol Nitrate) (Vincent, 1970)**

#### Solution A

Mannitol	10g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	0.45g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10H <sub>2</sub> O	0.06g
KNO <sub>3</sub>	0.60g
FeCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.01g
Thiamine-HCl	100µg
Biotine	0.5µg
Agar	7.5g
Eau distillée	1000ml

#### Solution B

MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1g
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1g
Eau distillée	100ml

Les deux solutions A et B sont stérilisées séparément (Autoclave 120°C pendant 20 minutes), puis ajouter 0.5ml de A.

### **Différent matérielle du SDS-PAGE (laemmli, 1970)**

#### **Tampon de lyse**

Tris	25mM
Glycérol	192mM
SDS	2.5%
B- Mercaptoéthanol	2.5%
Bleu de Bromophénol	5mg
Eau distillée	200ml

#### **Solutions stocks**

Solution d'acrylamide	
Acrylamide 30%	60g
Bis acrylamide 0.8%	1.6g
H <sub>2</sub> O	QSP 200 ml

**Tampon resolving : Tris- HCl 3M pH 8.8**

Tris 3M	72.7g
SDS 0.8%	1.6g
DDt	0.8 ml
H <sub>2</sub> O	QSP 200 ml

Adjuster à pH 8.8 avec HCl.

**Tampon stacking: Tris-HCl 0.5M pH 6.8**

Tris 0.5M	12.2g
SDS 0.4%	0.8g
MCE 0.2%	400µl
H <sub>2</sub> O	QSP 200 ml

Adjuster à pH 6.8 avec HCl.

**Preparation des gels****Gel de separation (resolving gel) à 12%**

Solution d'acrylamide	10.4 ml
Tampon resolving	3.14ml
Tetraméthylènediamine (TEMED)	12.5µl
H <sub>2</sub> O	QSP 25 ml

**Gel de concentration (stacking gel) à 7.5%**

Solution d'acrylamide	5ml
Tampon stacking	5ml
TEMED	20µl
H <sub>2</sub> O	QSP 20 ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate d'ammonium (ammoniumperoxodisulfate) 15%.

Préparer 0.15g de persulfate dans 1ml d'eau distillée et ajouter au :

Resolving gel	140µl
Stacking gel	200µl.

**Tampon de migration pH 8.3**

Tris 0.025M	1.06g
Glycine 0.192M	5.04g
SDS 0.1%	0.35g
MCE 0.05%	175µl
H <sub>2</sub> O	QSP 350 ml

**Solution de coloration**

Solution mère (bleu de Comassie et de methanol)	25ml
Acide tricholacétique (TCA) 60%	40ml
Eau distillée	QSP 200ml.

## **Annexe 2**

### **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 a immersion.

Nom : **CHABBI**  
Prénom : **Rabah**

Date de soutenance : **14/01/2010**

---

**Titre : Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien.**

---

**Nature du diplôme : Magistère (Ecole Doctorale) en Biotechnologie végétale.**

---

**Résumé :**

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique qui existe au sein d'une collection des symbiotes isolés à partir des nodosités de trois population de Fenugrec issues de différentes régions de l'Est algérien.

La SDS page a révélé un grand niveau de polymorphisme moléculaire entre les isolats. Cette technique nous a permis de mettre en évidence la possibilité d'une infection multiple chez *Trigonella*.

Toutes les souches sont infectives vis-à-vis de *Trigonella* avec une efficacité relative, qui est traduit par un bon niveau de croissance des pieds obtenus.

La croissance rapide des souches ainsi que l'assimilation des substrats carbonés a révélé des profils comparables à ceux du *Rhizobium*. A l'opposé, elles se sont révélées, comme les Gammaproteobactéria, très résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques. Une large tolérance à l'NaCl, au pH et à la température a été notée pour l'ensemble de la collection.

Nous avons pu repérer, sur la base du potentiel fixateur d'azote et la tolérance à l'alcalinité, des candidats assez performants qui peuvent être utilisés pour l'inoculation au champ.

**Mots clés :** Caractérisation, Symbiote, *Trigonella*, *Rhizobium*, Gammaproteobacteria,

---

**Laboratoire de recherche :**

Laboratoire d'Ecologie Microbienne – Département de Biochimie-Microbiologie – Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri Constantine.

---

**Directeur de la thèse : Docteur Yacine BENCHIZIA**

**Membres jury :**

**Président : Mm. N. Khalfallah**

**Professeur. Université de Constantine**

**Examineurs : Mr. A. Benguedouar**

**Professeur. Université de Constantine**

**Mr. A. Boudemagh Maître de Conférences. Université de Constantine**