

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option: Biologie moléculaire et cellulaire
Département: Biologie

**Thème : Isolement et Caractérisation des bactéries
nodulants la plante légumineuse *Mellilotus***

Présenté par :

BENKIRAT ISMAHANE
DENNA WIDAD

Devant le jury composé de :

Président: M_R ROUABHIA KAMEL M.A.A
Examineur : M^{me} BRAIK ASMA M.A.A
Encadreur : M^{me} TORCHE ESMA M.C.B

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

Juin 2016

REMERCIEMENTS

Nos remerciements sont d'abord au «Dieu », qui nous a donné la bonne santé, la volonté et la patience tout le long de la période de nos études.

Nous tenons à adresser l'expression de nos profonds remerciements à notre encadreur
M^{me} Torche Asma qui nous a fait l'honneur de bien vouloir
assuré la direction de ce mémoire. Nous vous remercions pour votre soutien, la pertinence de
vos conseils, votre grande disponibilité, votre patience
et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.

Un grand merci aux membres de jury pour nous avoir fait l'honneur d'examiner
Et d'évaluer notre travail :

Mr Rouabhia Kamel M.A.A à l'Université Guelma ; président du jury et
M^{me} Braik asma M .A.A à l'Université de Guelma ; examinateur de ce travail.

Nous n'oublions pas d'adresser nos remerciements à
M^{me} Hassiba, l'ingénieur du laboratoire de microbiologie
pour son aide ainsi que toute l'équipe du laboratoire de biochimie.

Merci à toute l'équipe du laboratoire du département SNV de l'université de Guelma; à mes
collègues du laboratoire de microbiologie
pour leur soutien matériel et morale.

Enfin je remercie toutes les personnes qui 'm'ont aidé, de près ou de loin.

Merci à toute l'équipe de l'université de 08mai 1945

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes

*Chers parents **Hamadi** et **Fatiha** qui m'ont dirigée et suivie*

Durant toutes mes années d'étude, et aussi pour leurs Sacrifices,

Leur patience sans limite et l'éducation

Qu'ils m'ont donnée, je leurs dit merci mille fois.

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

*Mon cher fiancé : **Rafik***

*Mes chers frères : **Ali, Kamani***

*Et surtout à mes sœurs: **Samira, Fouzia, Nadjiba***

*Et ma petites : **Raid, Sirrin, Inas, Aysem,***

Mayson, Mouhamed, Mouhamed Adhem

Egalement je dédie ce travail à mes adorables amies:

***Widad, yassmine ,fatiha,zahra,nadia** et surtout **Nassrine** .*

Enfinement je dédie ce travail à ma belle famille.

Ismahane

Dédicace

*Avant tout je remercie **le Dieu** le tout puissant, de m'avoir donné suffisamment de courage et surtout de patience pour réaliser ce travail.*

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à

Mes chers parents,

Source de tendresse et de sacrifice et mon respectueux

*« **Mon père** »*

La flamme qui éclaire ma vie

*« **Ma mère** ».*

Que je ne cesserai jamais de remercier. Leur soutien et leurs encouragements durant mes années d'étude, et aussi pour leur sacrifice,

Leur patiente sans limite et l'éducation qu'il m'ont donnée,

Je leur dit merci mille fois.

Puisse Dieu me les garder.

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

*Mes frères **Kheir eddine, Mohammed, Salah eddine***

*Mes sœurs **Nadia et Hafida***

Leurs filles et fils

Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

*Je n'oublier pas mon fiancée **Oussama**, qui a toujours été à mes côtés, surtout dans les moments les plus difficiles.*

A mes très chère cousines,

A toutes mes amies et collègues

A tous ceux qui me sont chers, à tout ceux qui m'aime, A tous que j'aime

Je dédie ce travaille

Widad

الملخص

هذا العمل يهدف تعريف البكتيرية المعزولة من العقد الجذرية للنبات البقولي *Mellilotus officinalis* المتواجد بمنطقة قالمة (شرق الجزائر) . العزلات تم تعريفها بدراسة مورفولوجية تليها سلسلة من الاختبارات المظهرية بما في ذلك اختبارات غذائية وتأثير العوامل اللاحيوية و والبحث عن الانزيمات الخاصة و تبين حساسية و مقاومة المضادات الحيوية.

تمت هذه الدراسة بتواجد سلالات مرجعية من الريزوبيا.

النتائج المحصل عليها اظهرت ان عزلتنا لها مواصفات مشابهة للـ *Rhizobium* و بعض السلالات ظهرت كالـ *Bradyrhizobiumes* و جد مقاومة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: *Mellilotus, Rhizobium*, نبات بقولي, تعايش, عقد جذرية .

Résumé

Le but de ce travail est de caractériser les bactéries isolées à partir des nodules de la plante légumineuse *Mellilotus officinalis*, localisée dans la région de Guelma (l'Est de l'Algérie). Les isolats sont identifiés par une étude morphologique suivie d'une série de tests phénotypiques comprenant des tests nutritionnels, effet des facteurs abiotiques, recherche des enzymes spécifiques et détermination de la sensibilité et la résistance aux antibiotiques. Cette étude est faite en présence de souches de référence de rhizobia.

Les résultats obtenus montrent que nos isolats ont une description comparable à celle de *Rhizobium* et certaines souches sont révélées comme des *Bradyrhizobiumes*, très résistantes aux antibiotiques.

Mots clés : *Rhizobium*, *Mellilotus*, légumineuses, symbiose, nodule.

Abstract

The aim of this work is to characterize the bacteria isolated from nodules of leguminous plant *Mellilotus officinalis*, located in the region of Guelma (east of Algeria). The isolates were identified by morphological study followed by a series of phenotypic tests including nutritional tests, effect of abiotic factors, search for specific enzymes and determining sensitivity and resistance to antibiotics. This study is made in the presence of rhizobia reference strains.

The results obtained showed that our isolates have a description comparable to that of *Rhizobium* and some strains proved as *Bradyrhizobium*, very resistant to antibiotics.

Keywords: *Rhizobium*, *Mellilotus*, legumes, symbiosis, nodule.

Listes des figures

Figure 01 : Cycle de l'azote	3
Figure 02 : La structure du nitrogénase.....	7
Figure 03 : La plante légumineuse (Mellilotus).....	10
Figure 04 : La symbiose légumineuse-rhizobium.....	19
Figure 05 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	20
Figure 06 : Conservation des nodules sous CaCl ₂	21
Figure 07 : Ensemencement par la technique des cadrans	22
Figure 08 : Antibiogramme	26
Figure09 : Aspect des colonies sur les milieux YMA et YMB.....	27
Figure10 : Absorption du rouge Congo.	28
Figure11 : Absorption du GPA-BCP.	28
Figure 12 : absorption de l'YMA-BTB.....	29
Figure 13 : examen microscopique par la coloration de Gram.	31
Figure 14 : résultats de test du mannitol mobilité.	31
Figure 15 : utilisation des sucres par toutes les souches testées.....	33
Figure16 : Résultats des différents tests biochimiques.	36
Figure 17 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes souches testées.....	38
Figure 18 : Effet du pHsur toutes les souches testent.....	40
Figure 19 : résistance aux antibiotiques	41

Liste des tableaux

Tableau01 : Taxonomie courante des rhizobia.....	12
Tableau 2 : les souches utilisées dans cette étude.	24
Tableau 03 : Résultats des caractères cultureux des souches testés.	30
Tableaux 04 : résultats du teste mannitol mobilité.	32
Tableau 05 : Résultats des tests biochimiques.....	35
Tableau 06 : Température de croissance testée.....	39
Tableau 07 : Résultats des tests des antibiotiques.	42

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre 1 : revue bibliographique

1-Fixation biologique de l'azote	3
1-1- Azote	3
1-2-Cycle de l'azote.....	3
1-2-1-Fixation de l'azote.....	4
1-2-2- Ammonification	4
1-2-3- Nitrification.....	4
1-2-4- Dénitrification	4
1-3-Fixation biologique de l'azote	5
1-3-1-Les fixateurs libres	5
1-3-2- Les fixateurs symbiotiques	6
1-4- Mécanisme biochimique de la fixation de l'azote (Nitrogénase)	7
1-4-1-Structure	7
1-4-2-Fonction et régulation	8
2-La symbiose plante légumineuses- bactéries	8
2-1-Le macrosymbiote : Les légumineuses	8
2-2- Le microsymbiote : Les Rhizobia	10
2-3- La nodulation	13
2-3-1- La nodulation chez la bactérie	14
2-3-2- La nodulation chez la plante	17

Chapitre 2 : matériel et méthodes

1- Isolement des bactéries à partir des nodules	20
1-1- Collecte des nodules	20
1-2- Conservation des nodules	21
1-3- Isolement des bactéries	21
1-3-1- stérilisation des nodules	21
1-3-2- Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés.....	22
2- Caractères culturaux.....	23
2-1- Les milieux utilisés	23
2-2- Ensemencement sur milieux liquides et solides.....	23
3- Conservations des souches.....	23
4- Examen microscopique par la coloration de Gram.....	23
5- Examen de la mobilité	24
6- Caractérisation des isolats.....	25
6-1- Source de carbone	25
6-2- Tests biochimiques.....	25
6-2-1- Réduction des nitrates	25
6-2-2- activité uréasique.....	25
6-3- Tests physiologiques	25
6-3-1- Tolérance au NaCl	25

6-3-2- Température de croissance.....	26
6-3-3-Effet de pH.....	26
6-4- Résistance aux antibiotiques	26

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1-Caractères culturaux.....	27
2-Examen microscopique par la coloration de Gram.....	31
3-Examen de la mobilité	31
4-Caractérisation des isolats.....	32
4-1-Source de carbone	32
4-2-Tests biochimiques.....	34
4-2-1-Réduction des nitrates	34
4-2-2- activité uréasique.....	34
4-3-Tests physiologiques	37
4-3-1-Tolérance au NaCl	37
4-3-2-Température de croissance.....	39
4-3-3-Effet de pH.....	40
4-4- Résistance aux antibiotiques	42
Conclusion et perspective.....	44

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Le sol constitue un support pour différents cycles d'échanges d'énergie et de transfert de substances entre les différentes entités qui l'abritent. Un des cycles les plus importants est le cycle de l'azote (El-Hilali, 2006). Les végétaux terrestres tirent généralement leur azote du sol, sous forme de nitrates ou de sels d'ammonium, produits de décomposition des matières organique par des micro-organismes (René et *al.*, 1998). La fixation biologique de l'azote (N_2) s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia, parce que ces associations ont le plus grand impact quantitatif sur ce cycle (El-Hilali, 2006).

La famille des Légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales (Saoudi, 2008).

La région de l'Est algérien a un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humides, subhumides et semi arides. Elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées, parmi elles les espèces du genre *Mellilotus*, qui appartenant à la famille des légumineuses, sous famille de papilionacées, et composé d'un nombre d'espèces avec une répartition étendue dans le monde. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Europe, France et en Asie Occidentale (E).

L'association symbiotique plante légumineuse- bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. Propriété également dévolue à certains micro-organismes libre (René et *al.*, 1998). Cette association présente un haut niveau de spécificité d'hôte basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires. Les plantes produisent des

molécules-signal (flavonoïdes) au niveau de leurs racines. Ce signal, une fois perçu par la bactérie induit l'expression des gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod. Ceux-ci sont des signaux de la nodulation ciblant le programme organogénique de la plante et conduisant à la formation des nodules (Gage, 2004).

Auparavant les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.L.) comprenant notamment les espèces du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, qui ont une signification scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Somasegaran et Hoben, 1994).

L'objectif de notre étude est l'identification des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse *Mellilotus*.

Nous avons entrepris dans ce travail une caractérisation morphologique des isolats suivie d'une caractérisation phénotypique (tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels) des bactéries isolées des nodules racinaires de cette plante légumineuse et médicinale poussant dans différentes régions de l'Est algérien.

Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules
- Etude morphologique et microscopique
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests.

Revue bibliographique

1-Fixation biologique de l'azote

1-1- Azote

L'azote est une molécule essentielle qui représente le quatrième élément nutritif important des plantes, Présent dans l'atmosphère en grande quantités (78% en volume). C'est un gaz incolore et inodore qui se trouve également sous forme de (N_2 ou diazote) (François et *al.*, 1997 ; Hopkins, 2003 ; Raven et *al.*, 2014 ; Wolfgang et *al.*, 2009).

La majorité des organismes vivants ne peuvent pas assimiler l'azote atmosphérique directement pour la synthèse de leurs acides aminés et des autres composés azotés, mais il doit être converti en nitrate (NO_3^-) ou, parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Figarella et *al.*, 2007 ; Hopkins, 2003 ; Raven et *al.*, 2014 ; Wolfgang et *al.*, 2009).

1-2-Cycle de l'azote

Le cycle biogéochimique de l'azote est le plus complexe contrairement au carbone, l'azote est disponible en grandes quantités dans l'atmosphère, mais il est difficilement assimilable par les organismes bien qu'il puisse entrer dans la biomasse sous différentes formes et par différentes voies, l'ensemble constitué par l'atmosphère ,la biomasse vivante et la biomasse morte, Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins, 2003; Meyer et *al.* ,2004; Wolfgang et *al.*, 2009).

En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, d'ammonification, de nitrification et de dénitrification. (**Figure 01**).

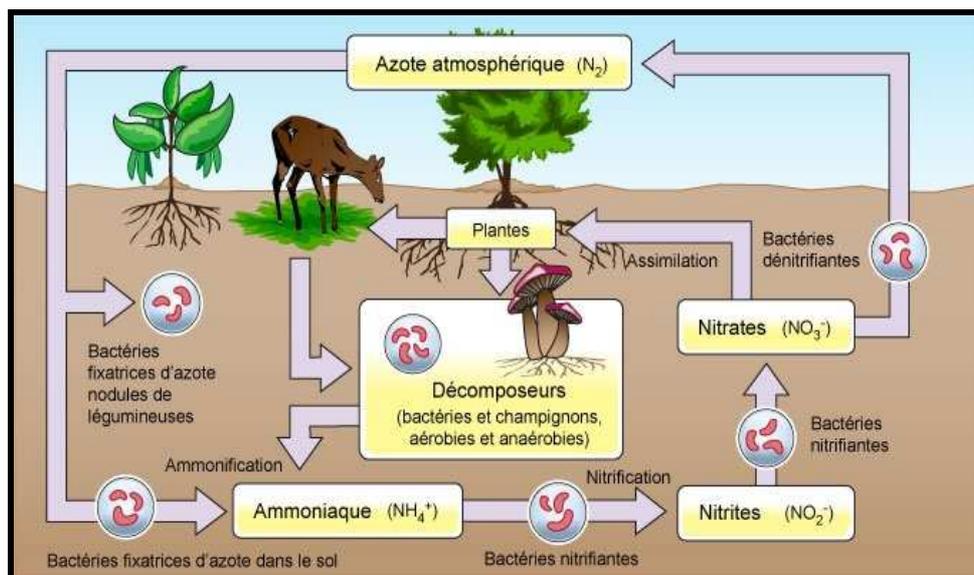


Figure 01 : Cycle de l'azote (B).

1-2-1-Fixation de l'azote

La fixation de l'azote est le processus par lequel l'azote atmosphérique est transformé en ammoniac.

1-2-2- Ammonification

La majeure partie de l'azote du sol dérive de déchet organique, qui se présentent comme des molécules complexe telle que les protéines ; ces dernier sont en générale rapidement décomposés en molécules plus simple (Raven et *al.*, 2014).

Au coure de cette décomposition, l'azote organique est transformes en ammoniac par une série de micro-organismes telle que les bactéries aérobies, bactéries anaérobies strictes ou facultatives, moisissures, etc. (Hopkins, 2003 ; A).

En milieu alcalin, l'azote peut se transformer en ammoniac gazeux (NH₃). Cette dernière transformation ne se produite cependant en générale que lors de la décomposition de grande quantité de matière riche en azote. Dans le sol ; l'ammoniac produite par ammonification se dissout dans l'eau du sol, il s'y combine aux protons et produite l'ion ammonium (Bertrand et *al.*, 2011 ; Perry et *al.*, 2004 ; Raven et *al.*, 2014).

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



NH₄⁺ est ensuite, soit absorbé par les plantes est les micro-organismes, soit oxydé en nitrate (François et *al.*, 1997).

1-2-3- Nitrification

La première étape de la formation de nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite (NO₂⁻) par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus* (Hopkins., 2003), les nitrites sont toxiques pour les plantes, mais ils s'accumulent rarement dans le sol. *Nitrobacter*, autre genre des bactéries, oxyde les nitrites en ions nitrate (NO₃⁻) (Bertrand et *al.*, 2011 ; Lydie, 2015 ; Perry et *al.*, 2004 ; Pidello, 2014 ; Raven et *al.*,2014).

1-2-4- Dénitrification

La principale perte d'azote par le système sol-plante provient de la dénitrification, processus anaérobie aux cours duquel certaines bactéries des genres *Pseudomonas* et *Paracoccus*, utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons quand l'oxygène du sol est limitant (François et *al.*, 1997).

Qu'il soit réduit en forme volatile de l'azote, comme l'azote gazeux (N₂) et l'oxyde d'azote (N₂O) qui retournent ensuite à l'atmosphère. De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus (Bertrand et al., 2011 ; Pidello, 2014 ; Raven et al., 2014).



1-3-Fixation biologique de l'azote

Les plantes sont des organismes eucaryotes, caractérisés par la présence d'un noyau limité par une enveloppe. Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer le diazote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée.

La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes. La fixation d'azote est l'apanage du domaine des procaryotes simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac.

Les procaryotes qui fixent l'azote, nommés fixateurs d'azote (Hopkins, 2003 ; Perry et al., 2004). Seul quelques micro-organismes, symbiotiques ou libres sont capables de fixer l'azote gazeux en des composés organiques utilisables par les plantes pour la synthèse des acides aminés et des autres molécules organiques azotés (Figarella et al., 2007 ; Raven et al., 2014).

La découverte de cette propriété fixatrice de N₂ atmosphérique par les micro-organismes remonte à la fin du XIX^e siècle avec les travaux de plusieurs scientifiques dont Hellriegel et Wilfarth (1888)¹ et Beijerinck (1888)². Depuis, de nombreux genres et espèces bactériennes ont été reconnus comme fixateurs de N₂ atmosphérique (Kouakou Romain, 2011).

1-3-1-Les fixateurs libres

Le groupe des bactéries fixatrices libres non associées avec une plante spécifique fixe leur azote à l'état libre ou dans la rhizosphère de certaines plantes (François et al., 1997), elles sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003).

Bien que certaines espèces soient aérobies (ex. *Azotobacter*) la plupart d'entre elles ne fixent l'azote que dans la condition anaérobie ou dans des conditions de très faible pression partielle d'oxygène.

Les bactéries non symbiotiques des *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Beijerinckia* sont des bactéries aérobies capables de fixer l'azote, alors que le genre *Clostridium* est anaérobie (Raven et al., 2007).

1-3-2- Les fixateurs symbiotiques

Les plantes supérieures ne fixent pas l'azote atmosphérique. Toutefois un certain nombre d'entre elles en symbiose avec des diazotrophes existent encore à la fois dans le sol et à l'état d'organites symbiotiques dans la nodosité (Guignard, 2000).

Les bactéries symbiotiques sont de loin les plus importantes si l'on tient compte des quantités totales d'azote fixé, les plus communes sont *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, qui toutes deux pénètrent dans les racines de légumineuses (Raven et al., 2007).

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. Dans ces processus symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote (Hopkins, 2003).

Les bactéries procurent aux plantes une forme d'azote utilisable pour la synthèse de leurs protéines. De son côté, la plante fournit aux bactéries des éléments carbonés nécessaires à la production de leurs propres molécules azotées (Guignard, 2000).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte d'organes spécifiques qui sont les nodosités, à l'intérieur desquelles l'azote moléculaire atmosphérique est réduit en ammoniac, en retour la bactérie utilise les assimilats de la plante hôte comme source d'énergie (Hopkins, 2003 ; François et al., 1997).

Divers types d'associations symbiotiques s'établissent entre des plantes et des micro-organismes telle que l'interaction entre le genre *Azospirillum* et l'herbes : Des espèces du genre *Azospirillum* se développent sur la partie corticale d'herbes tropicales en se nourrissant de composés carbonés produits par la plante. En retour, la bactérie fixe de grandes quantités d'azote utilisées pour la croissance des deux partenaires (Perry et al., 2004).

1-4- Mécanisme biochimique de la fixation de l'azote (Nitrogénase)

1-4-1-Structure

La conversion de l'azote moléculaire en ammonium est réalisée grâce à un complexe enzymatique nommé nitrogénase ou dinitrogénase. Seules les cellules procaryotes sont capables de fixer l'azote principalement parce qu'elles sont les seules à posséder le gène qui code pour cette enzyme. La nitrogénase a été purifiée chez pratiquement tous les procaryotes fixateurs d'azote connus (Emile et al., 2004 ; Hopkins, 2003).

La nitrogénase est une enzyme très conservée tant au niveau biochimique que génétique.

C'est un complexe enzymatique formé de deux métalloprotéines de taille différente (Emile et *al.*, 2004 ; François et *al.*, 1997 ; Hopkins, 2003).

La protéine la plus petite est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques nommées protéine **II**, protéine à fer ou dinitrogenas réductase (homodimère de 64 Kda), mobile, joue le rôle de transporteur d'électrons.

La plus grande protéine du nitrogénase appelée protéine **I** ou Mo-Fe-protéine est un tétramère formée de deux sous unités α et deux sous unités β , il contient le site actif qui assurent la fixation et la réduction de N_2 et dont la masse moléculaire totale est de 220 KD.

Chaque protéine Mo-Fe contient deux ions molybdène sous la forme d'un cofacteur fer-molybdène-soufre. Elle contient également des clusters Fe_4S_4 mais dont on ne connaît le nombre exact, il varie en fonction de l'espèce (Emile et *al.*, 2004 ; François et *al.*, 1997 ; Guignard, 2000 ; Hopkins, 2003). (**Figure 02**)

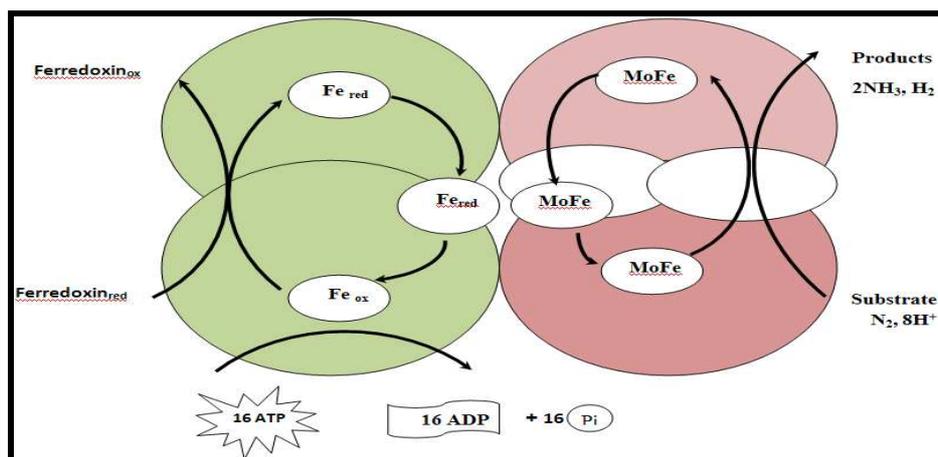


Figure 02 : La structure du nitrogénase (Yann, 2006).

1-4-2-Fonction et régulation

En présence d'azote moléculaire comme substrat, la réaction catalysée par la nitrogénase conduit toujours, à l'ammoniac. La réduction de diazote se déroule en deux temps : lors de la première étape, la Fe-protéine est réduite par un donneur primaire d'électrons, habituellement la ferredoxine. Lors de la seconde étape, la Fe-protéine réduite transfère les électrons à la protéine Mo-Fe qui catalyse à la fois la réduction du diazote gazeux et la production d'hydrogène (François et *al.*, 1997 ; Hopkins, 2003).

La protéine **II** transfère un électron à la protéine **I** en présence d'ATP et pour chaque molécule de diazote réduite, au moins 16ATP sont nécessaires, deux par électron (François et *al.*, 1997 ; Hopkins, 2003).

Le bilan global de la réaction catalysée par la nitrogénase est :



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.

Les deux composants de la nitrogénase sont irréversiblement inactivés par l'oxygène (Hopkins, 2003).

2-La symbiose plante légumineuses- bactéries

2-1-Le macrosymbiote : Les légumineuses

Les légumineuses représentent la plus grande famille d'angiosperme et la troisième plus grande famille de plantes à fleurs. Elles sont présentes dans presque tous les milieux terrestres. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales, comprenant des plantes herbacées, des arbres, des arbustes ou des lianes, à feuilles habituellement composées, rarement simples, généralement avec des stipules. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Parfois plus, caractéristiques, ressemblent souvent à des papillons. Fruit en gousse uniloculaire s'ouvrant en deux valves séparées et contenant de nombreuses graines (Benselama, 2015 ; Ghalem, 2009 ; Mouafek, 2010 ; Sebihi, 2008).

Cette famille des légumineuses possède 674 genres et plus de 18000 espèces (Sebihi, 2008). La plus grande partie des légumineuses (88%) des espèces étudiées interagissent avec les bactéries du genre *Rhizobium* pour former des nodules fixateurs d'azote. De ce fait les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Emile et *al.*, 2004 ; Saoudi, 2008).

Les légumineuses sont subdivisées en trois sous familles d'importance inégale :

Les *Caesalpinioideae* : cette sous-famille rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Parmi les espèces de *Caesalpinioideae*, seulement 23% ont été décrites comme étant capables d'être nodulées, leur fleur irrégulière

possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Dhane fitouri, 2011 ; Ghalem ,2009 ; Sebihi, 2008 ; Sousou, 2013).

Les Mimosoideae : ce sont pour la plupart des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces, parmi les 10% d'espèces déjà examinées, à plus de 90% sont nodulées. Leur fleur petite, et les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Dhane fitouri, 2011 ; Ghalem ,2009 ; Saoudi, 2008 ; Sebihi ,2008 ; Sousou, 2013).

Les Faboideae ou Papilionoideae : représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces, principalement herbes et petits arbustes distribués dans le monde entier, présentes en régions tempérées et tropicales, parmi les espèces testées 97 % sont nodulées, elles ont des fleurs en forme de papillon avec un pétale supérieur (Ghalem ,2009 ; Sebihi, 2008 ; Sousou, 2013).

- **La plante légumineuse : *Mellilotus***

Mellilotus plante d'origine Euro-asiatique, vient de grec mililots, nom de la plante, de meli qui signifie miel et de lotos, substantif s'appliquant à des plantes très diverses (Lissac, 1997). Les mélilots (genre *Mellilotus*) sont des plantes appartenant à la famille des fabacées (ou légumineuses), sous famille de papilionacées qui comprend des plantes herbacée annuelles ou bisannuelles, plus rarement vivaces. Haute de 60 à 120 cm, le feuillage est fait de feuilles trifoliées. Les fleurs sont blanches ou jaunes vif, regroupées en grappes allongées. Dont le fruit est une gousse et dont la corolle est composée de 5 pétales formant un étendard, deux ailes et une carène. Le nom évoque en grec un lotier (*lotos*) ayant l'odeur du miel (*meli*), sont souvent considérées comme des mauvaises herbes (F ; G ; Lissac, 1997 ; Quezel et Santa, 1962 ; Schauenberg et *al.*, 2009).



Figure 03 : La plante légumineuse (*Mellilotus*) (F).

Le Mélilot est une plante répandue dans presque toute la France en Europe et en Asie Occidentale (E).

Elle existe de nombreuses appellations pour désigner *Mellilotus officinalis* suivant les régions : Mélilot, trèfle de cheval, couronne royale, petit-trèfle jaune, trèfle des mouches, herbe aux puces et casse lunette (H ; Lissac, 1997).

Cette plante renferme un glucoside : Le mélilotosides, produisant au séchage de la coumarine, des flavonoïdes, Tannins et Polysaccharides mucilagineux (I ; Lissac, 1997). Elle inscrit à la pharmacopée depuis 1884, et utilisée comme plante médicinale pour aider les varices, insuffisances veineuses (jambes lourdes) et pour la bonne circulation du sang dans les microvaisseaux (E ; F ; H ; Lissac, 1997).

2-2- Le microsymbiote : Les Rhizobia

La nouvelle nomenclature a permis de classer les bactéries nodulants les légumineuses en 12 genres différents: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Devosia*, *Cupriavidus* (Autrefois appelé *Ralstonia*), *Herbaspirillum*, *Phyllobacterium* (Ghanimi, 2014).

La première bactérie nodulant une légumineuse a été isolée en 1888 par Beijerinck, et initialement nommée *Bacillus radicicola*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* *Rhizobium* : Du grec rhiza (qui signifie racine) et bio (vie), *Rhizobium* signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Dans la classification initiale des bactéries, les *Rhizobia* ont été décrits comme des procaryotes à Gram négatif, aérobie, chimiotrophes du

sol et non sporulantes. Ce sont des organismes de petites tailles d'environ 0,5 à 0,9 micromètres de largeur et 1,2 à 3 micromètres de longueur. Les *Rhizobia* sont par ailleurs des bactéries possédant soit un flagelle polaire ou 2 à 6 flagelles péritricheux pour leur déplacement.

Deux groupes de *Rhizobiums* ont été distingués sur le critère de leur vitesse de croissance : Le genre *Rhizobium* à croissance rapide, et le genre *Bradyrhizobium* à croissance lente (Agnoro, 2008 ; Riah, 2014).

Les *Rhizobia* comprennent donc l'ensemble des bactéries capables de former des nodosités sur une légumineuse. Cela correspond à des protéobactéries. Il y en a 5 genres dans l'embranchement des protéobactéries α :

- *Rhizobium* (avec Trefle, Pois, fève, haricot)
- *Mesorhizobium* (avec Lotus, acacia)
- *Sinorhizobium* (avec Medicago, trigonella, meliloti)
- *Azorhizobium* (avec sesbania rostrata)
- *Bradyrhizobium* (avec soja, mimosa) (C).

La combinaison des études polyphasiques et phylogénétiques a permis de modifier considérablement la taxonomie des rhizobies ces dernières années. Le tableau présente la diversité des rhizobies identifiés à partir de cette nouvelle approche en 2006.

Tableau01 : Taxonomie courante des rhizobia (Weir, 2012)

Genre	Espèce	Références
<i>Rhizobium</i>	<i>alamii</i>	Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>alkalisoli</i>	Lu et al. (2009b)
<i>Rhizobium</i>	<i>cellulosilyticum</i>	García-Fraile et al.
<i>Rhizobium</i>	<i>daejeonense</i>	(2007)
<i>Rhizobium</i>	<i>endophyticum</i>	López-López et al.
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	(2011)
<i>Rhizobium</i>	<i>galegae</i>	Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium</i>	<i>gallicum</i>	Type species
<i>Rhizobium</i>	<i>giardinii</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>hainanense</i>	<i>huanglingense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>herbae</i>	Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>huautlense</i>	Gu et al. (2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>indigoferae</i>	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>loessense</i>	Ramirez-Bahena et al.
<i>Rhizobium</i>	<i>lusitanum</i>	(2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>mesosinicum</i>	Ramirez-Bahena et al.
<i>Rhizobium</i>	<i>miluonense</i>	(2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>mongolense</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>multihospitium</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>oryzae</i>	<i>hedysari</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>phaseoli</i>	Zhang et al. (2011)
<i>Rhizobium</i>	<i>pisi</i>	formerly <i>Allorhizobium</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>tibeticum</i>	<i>undicola</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>sullae</i>	Ren et al. (2011)
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>	Wang et al. (2007)
<i>Rhizobium</i>	<i>tubonense</i>	Chen et al. (2010)
<i>Rhizobium</i>	<i>undicola</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>vignae</i>	Chen et al. (2011)
<i>Rhizobium</i>	<i>yanglingense</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>albiziae</i>	formerly <i>Rhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>alhagi</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>amorphae</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>australicum</i>	<i>huakuui</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>camelthorni</i>	formerly <i>Rhizobium loti</i> ,
<i>Mesorhizobium</i>	<i>caraganae</i>	Type species
<i>Mesorhizobium</i>	<i>chacoense</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>ciceri</i>	<i>mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>gobiense</i>	Vidal et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>huakuui</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	Zhou et al. (2010)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>mediterraneum</i>	Lu et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>metallidurans</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>opportunistum</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>plurifarium</i>	<i>tianshanense</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>robiniae</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>shangrilense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>tarimense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>tianshanense</i>	
<i>Sinorhizobium</i>	<i>americanum</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>abri</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>arboris</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>fredii</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>garamanticus</i>	

<i>Ensifer</i>	<i>indiae</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Ensifer</i>	<i>kostiensis</i>	<i>fredii</i> , former Type of
<i>Ensifer</i>	<i>kummerowiae</i>	<i>Sinorhizobium</i>
<i>Ensifer</i>	<i>medicae</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer</i>	<i>meliloti</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Ensifer</i>	<i>mexicanus</i>	<i>meliloti</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>morelense</i>	Lloret et al. (2007)
<i>Ensifer</i>	<i>adhaerens</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer</i>	<i>numidicus</i>	Li et al. (in press)
<i>Ensifer</i>	<i>saheli</i>	formerly <i>Blastobacter</i>
<i>Ensifer</i>	<i>sojae</i>	<i>denitrificans</i> ;
<i>Ensifer</i>	<i>terangae</i>	Islam et al. (2008)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>canariense</i>	formerly <i>Rhizobium</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>denitrificans</i>	<i>japonicum</i> , Type
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>	species.
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>iriomotense</i>	Ramírez-Bahena et al.
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	(2009)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>jicamae</i>	Ramírez-Bahena et al.
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>liaoningense</i>	(2009)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>pachyrhizi</i>	Chen et al (2007)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>yuanmingense</i>	Chen et al (2008)
<i>Burkholderia</i>	<i>caribensis</i>	Mantelin et al. (2006)
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	Mantelin et al. (2006)
<i>Burkholderia</i>	<i>mimosarum</i>	New: Ardley et al. (in
<i>Burkholderia</i>	<i>nodosa</i>	press)
<i>Burkholderia</i>	<i>phymatum</i>	New: Ardley et al. (in
<i>Burkholderia</i>	<i>sabiae</i>	press)
<i>Burkholderia</i>	<i>tuberum</i>	New: Ardley et al. (in
<i>Phyllobacterium</i>	<i>trifolii</i>	press)
<i>Phyllobacterium</i>	<i>ifriqiense</i>	New: Ardley et al. (in
<i>Phyllobacterium</i>	<i>leguminum</i>	press)
<i>Microvirga</i>	<i>lupine</i>	Type species
<i>Microvirga</i>	<i>lotononidis</i>	formerly <i>Azorhizobium</i>
<i>Microvirga</i>	<i>zambiensis</i>	<i>johannae</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	Zurdo-Piñeiro et al.
<i>Azorhizobium</i>	<i>doebereineriae</i>	2007
<i>Ochrobactrum</i>	<i>cytisi</i>	Lin et al. (2008)
<i>Ochrobactrum</i>	<i>lupine</i>	
<i>Methylobacterium</i>	<i>nodulans</i>	
<i>Cupriavidus</i>	<i>taiwanensis</i>	
<i>Devosia</i>	<i>neptuniae</i>	
<i>Shinella</i>	<i>kummerowiae</i>	

2-3- La nodulation

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement adaptée, régulée et spécifique entre la plante et la bactérie, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment et de manière autonome, et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries (Kouakou Romain, 2011 ; Riah, 2014).

Cette symbiose présente de nombreux avantages pour les légumineuses. En effet, celle-ci leur permet d'avoir une bonne croissance sur des sols carencés en azote. A l'opposé, la

plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie au cours de cette symbiose en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse (Kouakou Romain, 2011).

A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie intracellulaire se différencie en bactéroïdes capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase en ammonium ,certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Riah, 2014).

Les nodules sont deux types :

- Déterminées : toutes les bactéries sont au même stade de différenciation dans la zone centrale des nodosités rondes.
- Indéterminées : les nodosités sont à croissance apicale avec une forme allongée. La nodosité contient un méristème apical.

De même, il y a deux types de colonisation bactérienne possible. Chaque bactérie peut utiliser les deux modes d'infection :

- Crack Entry : pénétration au niveau d'une blessure.
- Colonisation par cordon d'infection: les bactéries pénètrent par les poils absorbants, c'est le mode le plus « évolué » (C).

2-3-1- La nodulation chez la bactérie

La nodulation chez les *Rhizobia* est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte et pour entamer cette symbiose, on décrit les gènes impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote (Dhane Fitouri; 2011).

2-3-1-1-Gènes *nod*

Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants (Grama Borhane, 2008). Ce sont nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités, d'autres gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités : les gènes *nol* et *noe* (Sebihi, 2008).

Les gènes de nodulation ou gènes *nod* incluent des gènes communs (*nod* A, B, C, I et J) et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) sont activés par les flavonoïdes des

exsudats racinaires émis par l'hôte et sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire (ou plasmide) du *Rhizobium* appelé plasmide *Sym* (Hopkins, 2003 ; Perry, 2004).

Parallèlement dans les bactéries, on trouve des gènes spécifiques de la nodulation, appelés Opéron *nod*. Ces opérons regroupent en fait trois catégories de gènes :

Les gènes *nod* commun (*nod* A, B, C, I et J), sont des gènes de nodulation communs à tous les *Rhizobia* (Hopkins, 2003). Ils sont synthétisés par tous les diazotrophes sans exception, et codent pour des enzymes, catalysant la synthèse du facteur de nodulation, ou facteur *nod* (synthèse du squelette de base des facteurs *nod*) (Sebihi, 2008). Ce sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces de *Rhizobia* et leur mutation provoquent une perte complètes de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes, en effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (Kouakou Romain, 2011).

Chez tous les *Rhizobia* et quelques soit le groupe auquel ils appartiennent, il existe au moins un gène *nod* D et des gènes *nod* A, B, C. D'où l'hypothèse d'une origine unique de ces gènes clés impliqués dans les échanges de signaux de nodulation.

Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses, ce transfert latéral des gènes de nodulations a contribué à l'évolution et à l'étendue de la capacité symbiotique (Chabbi ,2010 ; Grama borhane, 2008).

- **Les gènes *nod* D**

Se sont des gènes régulateurs qui codent pour la synthèse des protéines en présence de signaux (de type flavonoïdes) sécrétés par la plante, constituant le facteur de transcription et sont nécessaires à l'activation de l'expression des autres gènes *nod* de la bactérie sous l'action des flavonoïdes (Chabbi ,2008 ; Grama borhane, 2008). Chez les diazotrophes, ce gène s'exprime de manière constitutive. Les facteurs de transcription sont donc continuellement synthétisés, que la bactérie soit en symbiose ou non (Sebihi ,2008).

- **Les gènes *hsn***

Les gènes *hsn* (host specific nodulation) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter. Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les *Rhizobia*. Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Kouakou Romain, 2011).

2-3-1-2-Gènes *fix*

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote (Sebihi, 2008).

Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase.

2-3-1-3- Gènes *nif*

La synthèse de la dinitrogenas et la fixation d'azote est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Hopkins, 2003), également découverts sur les plasmides bactériens. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le *Rhizobium* libre, ils sont au nombre de 20 (Grama borhane, 2008).

Ces gènes codant pour les trois sous unités hautement conservées de la nitrogénase dont *nif* H, *nif* D, *nif* K ; *nif* H codent pour la réductase alors que *nif* D et *nif* K le font pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo. Les *nifs* B, E et N codent, eux, pour la synthèse du cofacteur FeMo de la dinitrogenas et enfin le *nif* S pour la maturation de la dinitrogenas (Grama borhane, 2008 ; Sebihi, 2008).

2-3-1-4- Facteurs *nod*

Les facteurs *nod* sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) produits par les différents gènes *nod*, *nol* et *noe*. Un polymère de N-acetyl-Dglucosamine avec des liaisons β -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 ; Gharzouli, 2013 ; Sebihi, 2008).

Les facteurs *nod* constituent un signal essentiel dans le développement symbiotique, ces signaux peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial. En absence des facteurs *nod*, les Rhizobia ne peuvent infecter les racines des légumineuses. Elles reconnaissent des flavonoïdes et d'autres molécules sécrétées par la plante hôte (Gharzouli, 2013 ; Kouakou Romain, 2011 ; Lydie, 2015 ; Sebihi, 2008).

Il est important que les facteurs *nod* conservent leur intégrité structurale, puisque chaque partie de leur structure assure une fonction cruciale dans le développement nodulaire. L'identification du signal *nod* est une étape essentielle dans l'établissement du dialogue

moléculaire à l'origine de la symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (Gharzouli, 2013 ; Perry, 2004).

2-3-2- La nodulation chez la plante

Les flavonoïdes sont des substances qui se trouvent chez les végétaux, où ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les bactéries du groupe *Rhizobium* (Saoudi, 2008). Ce sont des composés principalement excrétés au niveau des pointes racinaires, beaucoup d'entre elles stimulent la nodulation mais certaines espèces inhibent en fait le processus (Hopkins, 2003 ; Vernie, 2008).

L'interaction symbiotique déclenchée sous la responsabilité des flavonoïdes qui libérée par les racines des légumineuses et réorganisée par les facteurs *nod* des Rhizobia (Chabbi, 2008).

Chaque plante produit une mixture de flavonoïdes qui peut varier selon son état physiologique. Ce sont des dérivés du 2-phenyl-1,4-benzopyrone avec une structure définie par deux anneaux aromatiques et un cycle propane ou pyrane selon les modifications de cette structure, plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes, parmi lesquels les isoflavonoïdes sont spécifiques des légumineuses. Certains de ces flavonoïdes ont la capacité d'induire les gènes *nod* des bactéries requis pour la nodulation. Ces capacités varient selon les flavonoïdes et selon les Rhizobia. Certains flavonoïdes peuvent même inhiber l'expression des gènes *nod* (Vernie, 2008).

Les bactéries de genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont fréquemment impliquées dans des associations endosymbiotiques avec les légumineuses, l'établissement de cette association symbiotique passe par une série d'étapes complexes maintenant bien connues les étapes sont :

2-3-3-1- Pré-échange de signal d'infection

Dans un premier temps la bactérie et la plante mettent en place un système de « dialogue » basé sur un échange de molécule chimique, c'est la reconnaissance qui se fait en deux phases :

-Phase 1, d'attraction : quand la légumineuse est en manque d'azote, les racines excrètent des flavonoïdes qui attirent le *Rhizobium*.

-Phase 2, de reconnaissance : en réponse de ces flavonoïdes les *Rhizobactéries* activent leur gènes *nod*, qui codent pour les facteurs de nodulation *nod* (Lydie, 2015).

Pour chaque espèces bactériennes, différent par au moins un groupement (hydrogène acyle, méthyle ou sulfate) se qui explique en partie la spécificité des interactions. Les cellules des racines possèdent des récepteurs spécifiques des facteurs *nod* au niveau de leur membrane plasmiques. La réception des facteurs *nod* induit une chaînes de signalisation cellulaire cette chaîne aboutit à la synthèse des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes.

Ces facteurs, secrètes par le *Rhizobium* stimulent la division des cellules de la partie corticale des racines conduisant à la formation d'un méristème primaire (cellules en division active) (Hopkins, 2003 ; Lydie ,2015 ; Perry, 2004).

2-3-3-2-L'attachement

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de *Bradyrhizobiumes* et de *Rhizobium*. La rhicadhésine est une protéine liant le calcium. Elle permet l'adhésion en complexant le calcium présent à la surface des racines.

La phase d'adhésion entraîne une rétraction des racines en réponse à une sécrétion de molécules et la bactérie pénètre dans les cellules par un mécanisme d'invagination. La croissance et le déplacement de la bactérie dans la racine entraînent la formation d'une excroissance ou filament infectieux. L'infection s'étend progressivement aux cellules situées à proximité du site d'infection (Lydie ,2015 ; Perry, 2004).

2-3-3-3- Maturation des bactéroïdes et Développement du nodule

La division bactérienne rapide entraîne la formation d'un nodule, la majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane péri bacteroidienne enveloppe les bactéroïdes. Les bactéroïdes de forme irrégulière sont plus volumineux que les bactéries libres et ne sont pas capable de se diviser. Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, sont survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes situées dans le voisinage ou de celles qui se développeront ultérieurement sur le même site.

Dans les nodules, les bactéroïdes sont entourés de leghémoglobine. 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.

Le stade final du processus infectieux est la différenciation de la nodosité avec organisation en quatre zones, une zone méristématique (division), une zone de croissance et d'infection avec les cellules contenant les bactéroïdes, une zone de fixation d'azote et une zone de sénescence (Hopkins, 2003 ; Lydie ,2015 ; Perry, 2004)

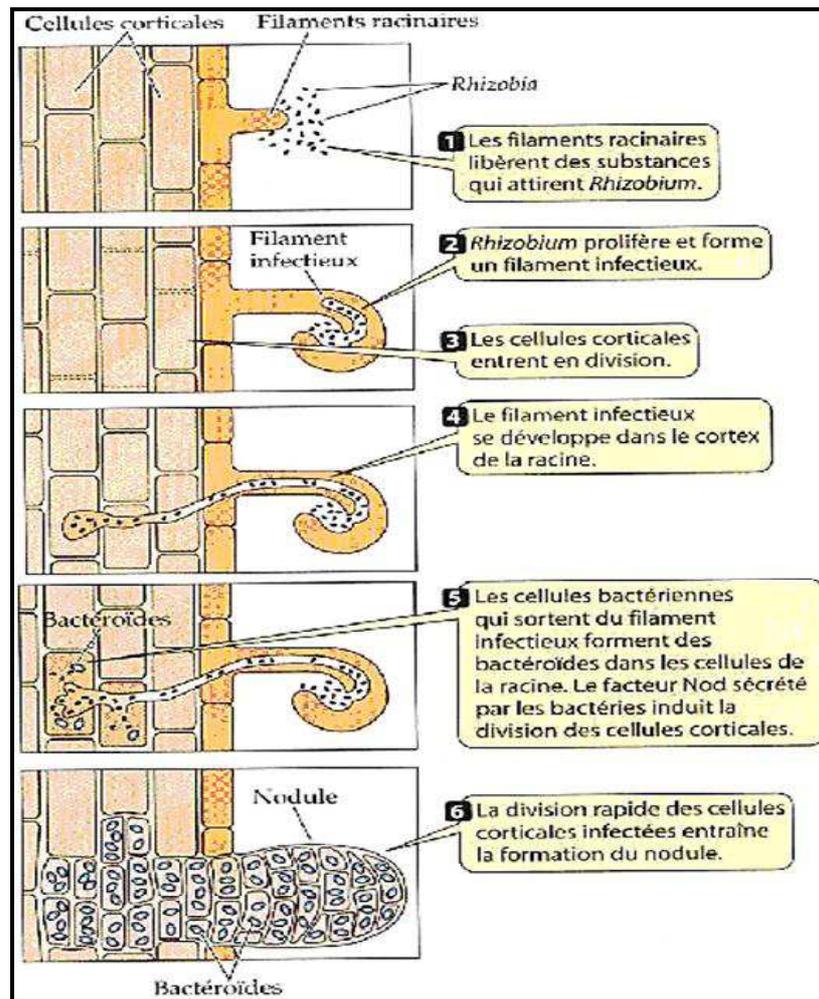


Figure 04 : La symbiose légumineuse-*rhizobium* (Perry, 2004).

Matériel
Et
Méthodes

1- Isolement des bactéries à partir des nodules

1-1- Collecte des nodules

Zone de prélèvement

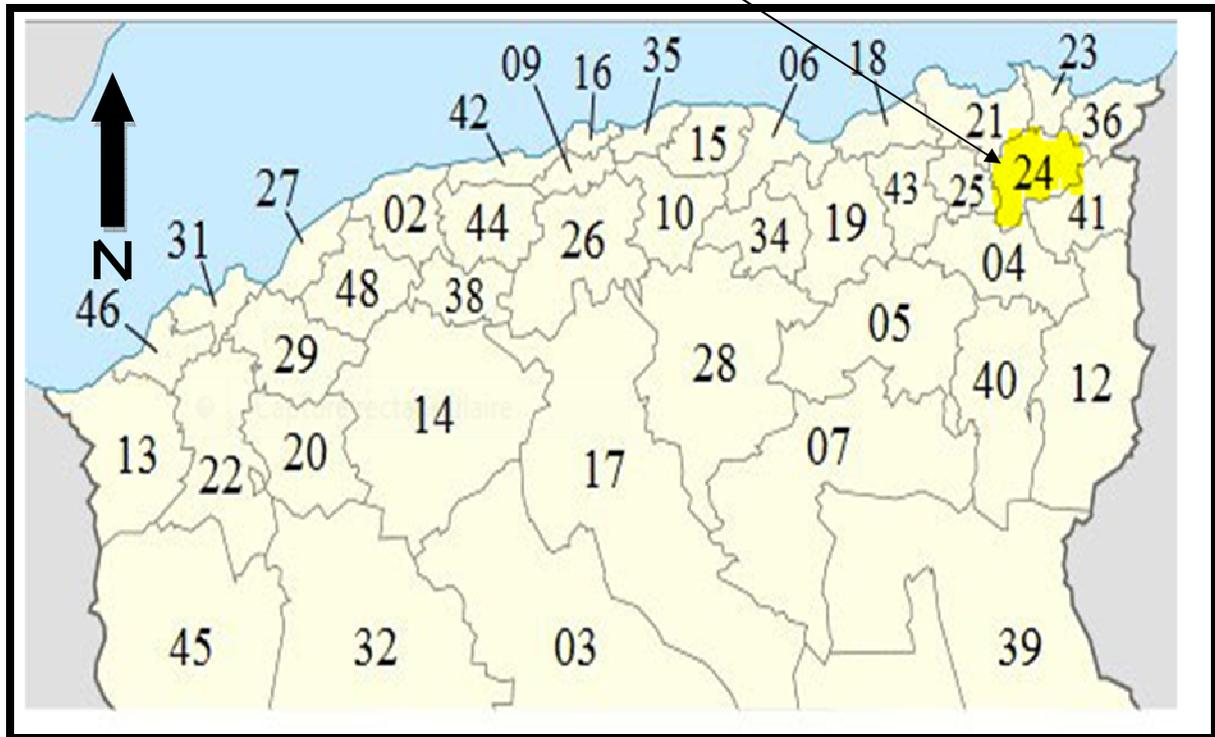


Figure 05: Localisation géographique de la zone de prélèvement

La collecte des nodules est faite à partir de la plante légumineuse *Mellilotus officinalis* située dans la région de Guelma (l'Est de l'Algérie). Campus de l'université 8 Mai 1945. (figure 05).

La récolte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran (1994) qui consiste à :
Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire, puis Enlever soigneusement le sol et casser les blocs de sol avec précaution pour éviter d'endommager les racines et les racines secondaires ou beaucoup de nodules sont souvent trouvé, ensuite Placer délicatement la plante dans un sachet de plastique.

Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante, Pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doit être coupées à l'aide d'un couteau de 1 à 2 mm de site d'attache de nodules, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables et propres de bactéries.

1-2- Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C Pour un usage immédiat.

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). La conservation et la dessiccation des nodules est réalisée dans des flacons en verre contenant le chlorure de calcium CaCl_2 et une couche de coton sur laquelle on met les nodules et fermés avec un bouchon.

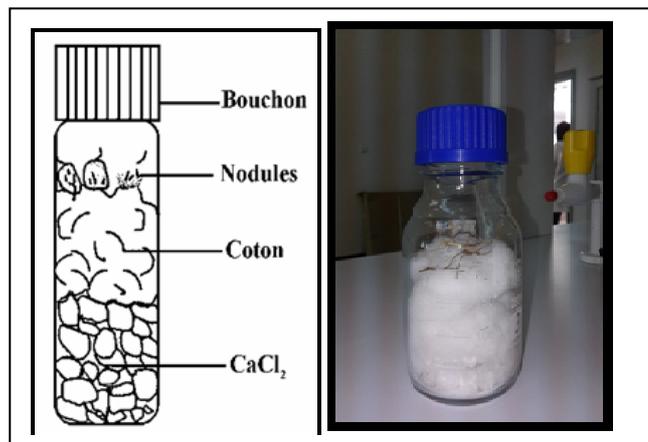


Figure 06 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

1-3- Isolement des bactéries

Les nodules qui ont déjà été conservés précédemment dans CaCl_2 sont placés dans un tube qui contient l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C, puis 1 heure à une température ambiante.

1-3-1- stérilisation des nodules

Sous la hotte, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié 3min, ensuite rincés dans l'eau distillée stérile 10 fois, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant 1 heure après le dernier rinçage.

1-3-2- Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Dans une boîte de pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile. Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile.

Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.

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 trois cadrans (Vincent ,1970). Sur les milieux YMA+ Rouge Congo, GPA+ Bromocrésol pourpre (Annexe1), puis incubé à 30°C pendant 24 à48 heures.

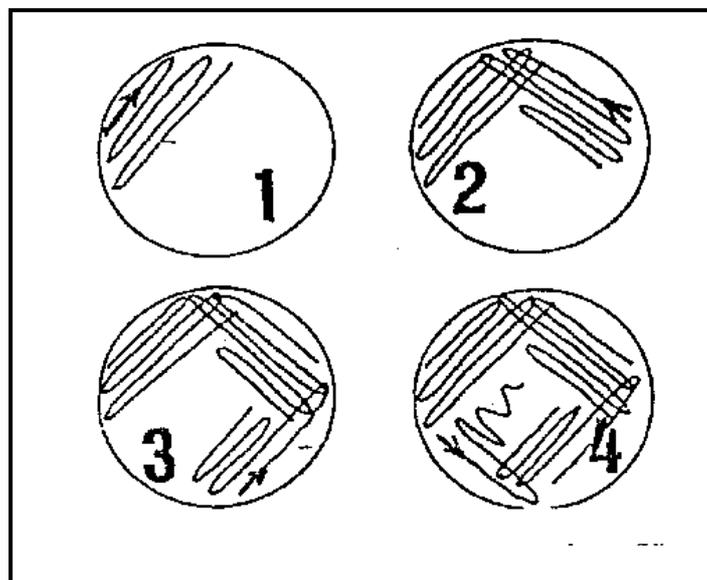


Figure 07: Ensemencement par la technique des cadrans

2- Caractères cultureux

2-1-Les milieux utilisés (Annexe 1)

La croissance bactérienne nécessite plusieurs source d'énergie pour cela nous avons préparé les milieux de culture spécifiques suivants:

- Milieu liquide : YMB (Yeast Mannitol Broth)

- Milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar)

YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

2-2-Ensemencement sur milieux liquides et solides

Toutes les souches sont ensemencées sur milieux solides(YMA) puis incubation à 30°C pendant 24 à 48h.

Sur milieux liquides les mêmes souches sont ensemencées dans des tubes (9ml) d'YMB et incubées 24 à 48h à 30°C.

L'ensemencement sur les milieux solides se fait à partir d'une culture d'YMA et étalés sur milieux BTB puis incubées 24 à 48h à 30°C.

3- Conservations des souches

La conservation des souches se fait sur l'YMA additionné de CaCO₃ (3g/l) comme agent neutralisant de l'acidité.

Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, on effectue des stries régulières sur la surface de la gélose.

Après incubation à 30 °C pendant 3 à 4 jours, les tubes sont conservés à 4 °C au réfrigérateur.

Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois.

4-Examen microscopique par la 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.

Cette coloration se fait à partir d'une culture YMB de chaque souche, la préparation d'un frottis est étalée en une couche mince sur une lame, séchée et fixée.

Le protocole expérimental consiste à :

- recouvrir le frottis par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- verser la lame et ajouter le lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone.
- laver à l'eau distillée.
- recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute.
- laver à l'eau distillée.
- observer au microscope.

5-Examen de la mobilité

L'examen se fait par une anse de platine contenant une suspension bactérienne réalisée sur le milieu YMB de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incuber pendant 24 heures.

Sur un nombre total de nodules récoltés à partir des racines de la légumineuse *Mellilotus officinalis*. Prélevée de l'Est Algérien(Guelma), nous avons tenu compte de 8 isolats dans cette étude (Tableau 2) qui ont été comparés avec la souche de référence.

Tableau 2 : les souches utilisées dans cette étude.

souche	Nom	Plante hôte	Géographique	Source
S	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S1	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S2	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S3	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S4	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S6	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S7	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
S9	Isolat	<i>Méllilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
SAM	<i>rhizobium</i> leguminosarum	Cicer arietinum	Constantine Algérie	S.dakkkiche Constantine
F	<i>R. sullae</i> RHF	<i>H. coronarium</i>	Pise, Italie	S.Casella- Pise
A6	<i>Rhizobiumsullae</i> sp. nov. RHA6	<i>H. coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar Constantine

6- Caractérisation des isolats

6-1- Source de carbone

Ce test est réalisé sur le milieu YMB où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Xylose, Galactose, Glucose, Sucrose, Amidon, Dextrine.

Les tubes sont incubés à 30 °C pendant 24 heures, puis on a mesuré la DO à 620nm.

6-2-Tests biochimiques

6-2-1-Réduction des nitrates

Les bactéries sontensemencée sur le milieu bouillon nitrate. Après 4 jours d'incubation à 30 °C on dépose à la surface de la culture 3 à 4 gouttes des réactifs de la nitrates réductase.

Réactif I : Acide sulfanilique à 3% dans l'acide dilué à 25%.

Réactif II : α naphthylamine à 0.5% dans l'acide dilué au même temps.

6-2-2- activité uréasique

Les souches sontensemencées sur le milieu urée indole, puis incubées à 30 °C pendant 24heure.

6-3-Tests physiologiques

6-3-1-Tolérance au NaCl

Les souches sontensemencés sur le milieu YMB ou l'NaCl est remplaces par les différentes concertations suivant : 0.5%,1% ,2%, 3%, 4%, 5%, 6% ,7%, 8%, 9%, 10%

-Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 heures.

- mesurer la DO à 620nm.

6-3-2- Température de croissance

Les différentes souches sont cultivées sur YMA et incubées aux températures suivantes : 4°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C.

Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

6-3-3-Effet de pH

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH : 4, 5, 6,7, 8, 9,10.

-Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 heures.

- On mesurer la DO à 620nm.

6-4- Résistance aux antibiotiques

L'ensemencement des souches cultivées sur le milieu YMB se fait par l'étalement des cultures par un râteau d'une pipette pasteur sur une boite de Petri contenant le milieu Muller Hinton.

Les antibiotiques utilisés sont : Amoxicilline, Chloramphénicol, Pénicilline, Vancomycine.

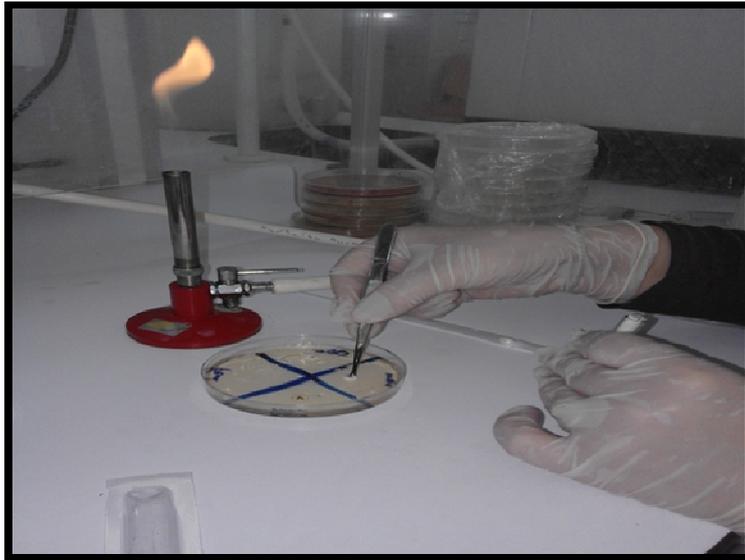


Figure 08 : Antibiogramme

Résultats

Et

Discussion

1- Caractères cultureux

La croissance sur milieu YMA (Yeast mannitol Agar) est détectable après 24 à 48 heures ; les colonies typiques et les souches de références sont abondantes avec une surface lisses, consistance crémeuse et visqueuse, texture homogène et translucide, de couleur blanchâtre ou crème (figure 10a).

Le milieu YMB utilisée comme support d'ensemencement d'un milieu à un autre, c'est un bouillon qui permet d'enrichir les colonies sélectionnées et suspectées d'être *Rhizobium*. Une fois ensemencé et après 24h d'incubation à 30 °C, il se caractérise par l'apparition d'un trouble ce qui été observée au niveau de tout nos isolats y compris les souches de références (figure 10b).



(a)



(b)

Figure09: Aspect des colonies sur les milieux YMA et YMB

(a) : Aspect des colonies sur YMA. (b) : croissance des bactéries sur le milieu YMB.

Les colonies sont bien poussés sur milieu YMA-Rouge Congo ; la majorité des isolats et les souches de références absorbent le rouge Congo et on trouve celles qui ne l'absorbent pas et gardent leur couleur blanchâtre (figure 11).

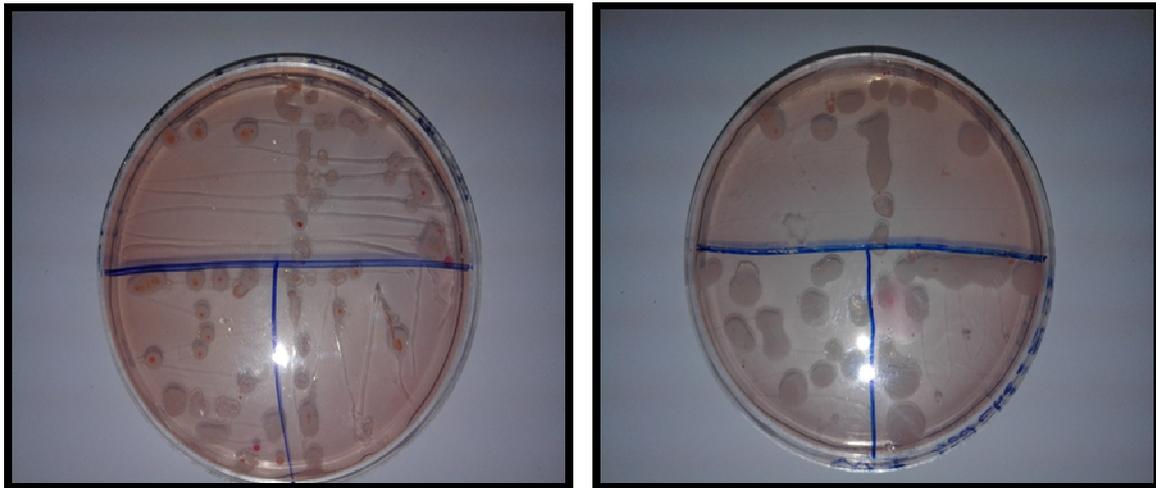


Figure10 : Absorption du rouge Congo.

Le développement des isolats et les souches de références sur le milieu GPA-bromocrésol pourpre se fait avec acidification du milieu et modification du pH avec un virage de couleur du milieu violet vers le jaune (figure 12).

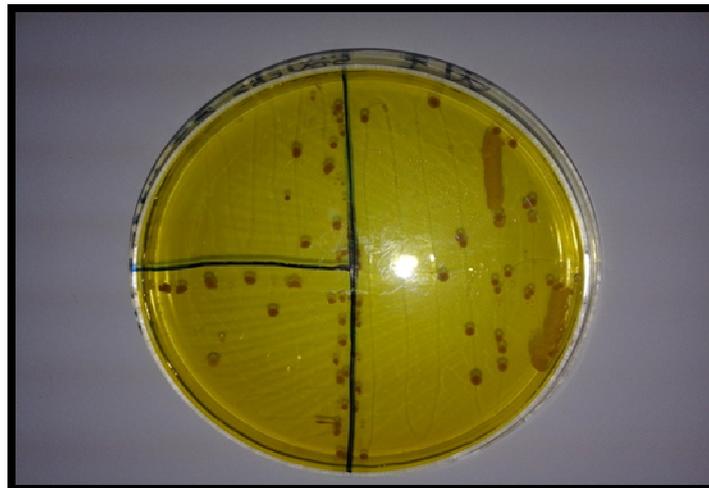


Figure11 : Absorption du GPA-BCP.

Sur le milieu YMA-BTB, l'ensemble des isolats et les souches de références modifient partiellement le pH après 24 heures, mais après 48 heures la plupart d'entre elles provoquent une réaction acide avec un virage de l'indicateur de pH, qui traduit par le changement de la coloration du BTB vers le jaune ce qui indique que nos isolats présente une croissance rapide.

À l'exception des souches S6 et A6 qui ont une croissance lente avec une modification du couleur vers le bleu se qui résulte une réaction basique (figure 13).



Figure 12 : absorption de l'YMA-BTB.

Tableau 03 : Résultats des caractères cultureux des souches testés.

Caractères Souches	Diamètre de colonie	Forme	Surface	Consistance	Caractères Optiques	Couleur	Croissance à 30°C
S	<3mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	translucide	Blanche	Rapide
S1	>3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	translucide	Blanche	Rapide
S2	>3 mm	bâtonnet	Lisse	visqueuse	Translucide Opaque	Crème	rapide
S3	<3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	Semi translucide	Blanche	rapide
S4	<3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	translucide	Blanche	rapide
S6	>3 mm	bâtonnet	Lisse	visqueuse	Translucide Opaque	Crème	rapide
S7	>3 mm	bâtonnet	Lisse	visqueuse	Translucide Opaque	Crème	rapide
S9	<3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	translucide	Blanche	rapide
SAM	<3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	translucide	Blanche	rapide
F	<3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	translucide	Blanche	rapide
A6	=3 mm	arrondie,	Lisse	visqueuse	Translucide Opaque	Blanche	rapide

2-Examen microscopique par la coloration de Gram

Une coloration de Gram est réalisée, qui va permettre d'observer les bactéries au microscope optique. L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets de taille différente et des coccobacilles roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (figure14).

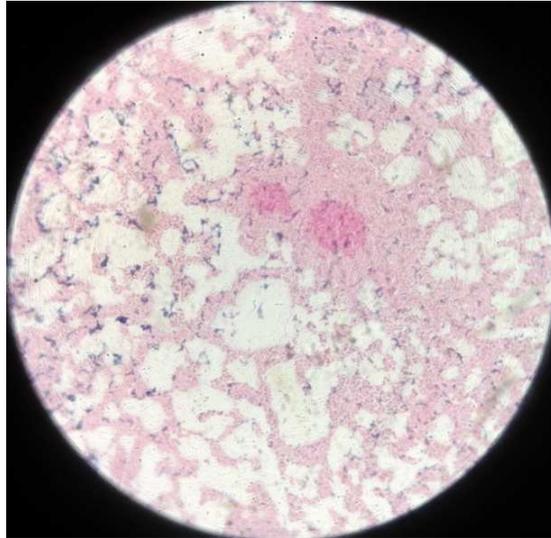


Figure 13 : examen microscopique par la coloration de Gram.

3-Examen de la mobilité

L'observation de l'envahissement sur le milieu mannitol mobilité de nos isolats et les souches de références confirme que les souches sont mobiles avec une acidification de milieu (figure15). Ces résultats sont compatibles à ceux indiqués par Chabbi (2010).



Figure 14: résultats de test du mannitol mobilité.

Tableaux 04 : résultats du teste mannitol mobilité.

Les souches	Résultats (virage de couleur)
S	Rouge
S1	Rouge
S2	Rouge
S3	Rouge
S4	Rouge
S6	Rouge
S7	Rouge vers l'orange
S9	Orange
SAM	Jaune
A6	Rouge
F	Orange vers le jaune

4-Characterisation des isolats

4-1-Source de carbone

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

Les résultats obtenus pour ce test et la mesure de la densité optique montrent que le sucrose, le galactose et l'amidon donnent un bon développement pour la plupart des souches, alors que les sucres les moins utilisés sont le glucose et la dextrine pour toutes les souches.

D'autre part on remarque que les souches de références utilisent préférentiellement l'amidon, et les sucres les moins utilisés sont le galactose et le sucrose au contraire à nos isolats.

Les résultats de cette étude montre que les isolats sont capables d'utiliser une grande variété de carbohydrates comme source de carbone, ce qui est confirmé par Vincent (1970) Jordan (1984), Lindstrom et Lehtomaki (1988) et Somasegaran et Hoben (1994).

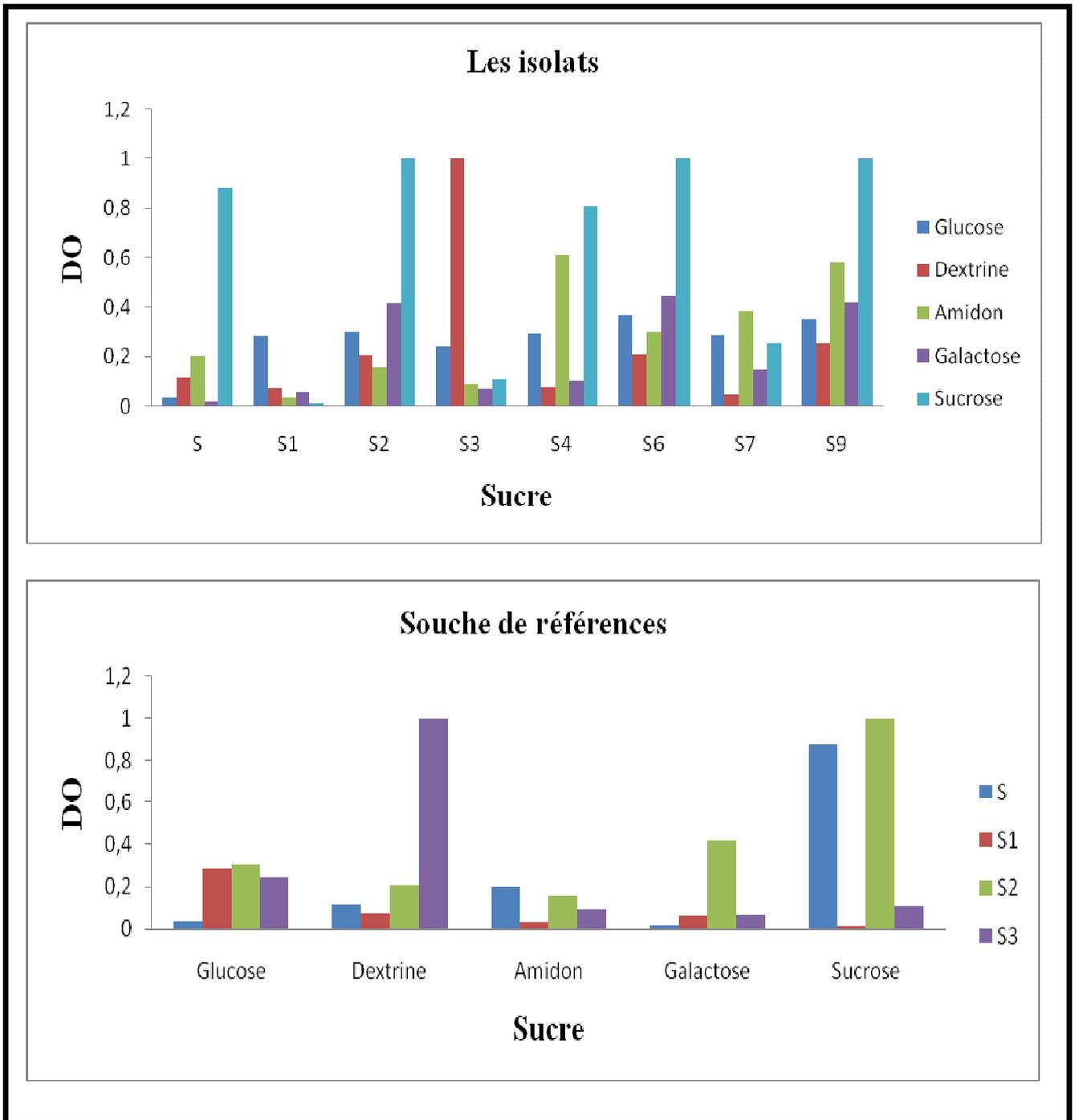


Figure 15 : utilisation des sucres par toutes les souches testées.

4-2-Tests biochimiques

4-2-1-Réduction des nitrates

Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs I et II de la nitrate réductase, certaines souches S3, S4, S6 et S7 donnent une couleur rouge se qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites et les autres souches S, S1, S2 et S9 donnent une couleur jaune ce qui signifie une réaction négative.

D'autre part nous avons signalé que les souches de références F, SAM sont comparables à nos isolats qui donnent une réaction positive, sauf la souche A6 qui donnent une réaction négative.

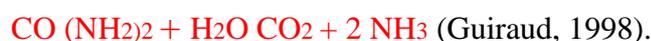
La coloration rouge ou rose traduit la présence de l'enzyme qui décompose les nitrates en nitrites.

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

4-2-2- activité uréasique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries d'hydrolyser l'urée grâce à l'uréase.

Les isolats et les souches de références ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu de culture en observant un virage de la couleur du orange vers le rouge ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme s'est montré dans l'équation suivant :



Par contre les isolats S6 et S7 n'a donné aucune alcalinisation du milieu, ce qui indique l'absence de l'activité uréasique chez ces derniers (Figure 17).

La majorité des isolats possèdent les enzymes spécifiques au processus d'infection avec les souches de référence, ce qui les englobe dans le groupe des bactéries nodulants les légumineuses (B.N.L).

L'aptitude des souches à hydrolyser l'urée ou à réduire le nitrate a révélé une grande variabilité. Cependant, les souches à croissance très rapide ont montré des résultats négatifs et par conséquent, un excès d'urée ou de nitrate exogène dans le sol pourrait affecter le caractère symbiotique de ces souches (el hilali ,2006)

Tableau 05 : Résultats des tests biochimiques

Enzyme souche	Nitrate réductase	Uréase
S	-	+++
S1	-	+
S2	-	+
S3	+	+
S4	+	++
S6	+	-
S7	+	-
S9	-	++
SAM	+	+++
F	-	++
A6	+	+

+++ : Forte alcalinisation

++ : alcalinisation moyenne

+ : faible alcalinisation

- : aucun alcalinisation.



Réduction de nitrate négative (-).



Réduction de nitrate positif(+).



Activité uréasique

Figure16: Résultats des différents tests biochimiques.

4-3-Tests physiologiques

4-3-1-Tolérance au NaCl

Les résultats obtenus montrent que jusqu'à une salinité de 3% de NaCl, la croissance des souches est élevée. A une concentration de 10% la croissance des souches n'est pas affectée, et par comparaison on observe que les souches de références croissent en présence des concentrations de NaCl allant de 3% à 10%.

Ces résultats montrent que l'optimum de croissance de nos isolats est compris entre 0.5% et 3%.

D'après les résultats obtenus par (Zahran., 2001) et (Zahran *et al.*, 1985), les souches tolérantes et sensibles ont des évolutions respectives rapide et plus lente. En symbiose, le rhizobium est plus résistant à la salinité que son partenaire végétal.

Ainsi, la salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la fixation symbiotique de l'azote est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao *et al.*, 2002). Selon Kaseem *et al.*, (1985), il a été constaté que la sensibilité de la nodulation à la salinité est très variable, elle peut être inhibée par des, petites quantités de NaCl, cette inhibition peut être due à la sensibilité de rhizobium au sel, à la sensibilité de la plante-hôte et à celle de l'interaction rhizobium-plante hôte.

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

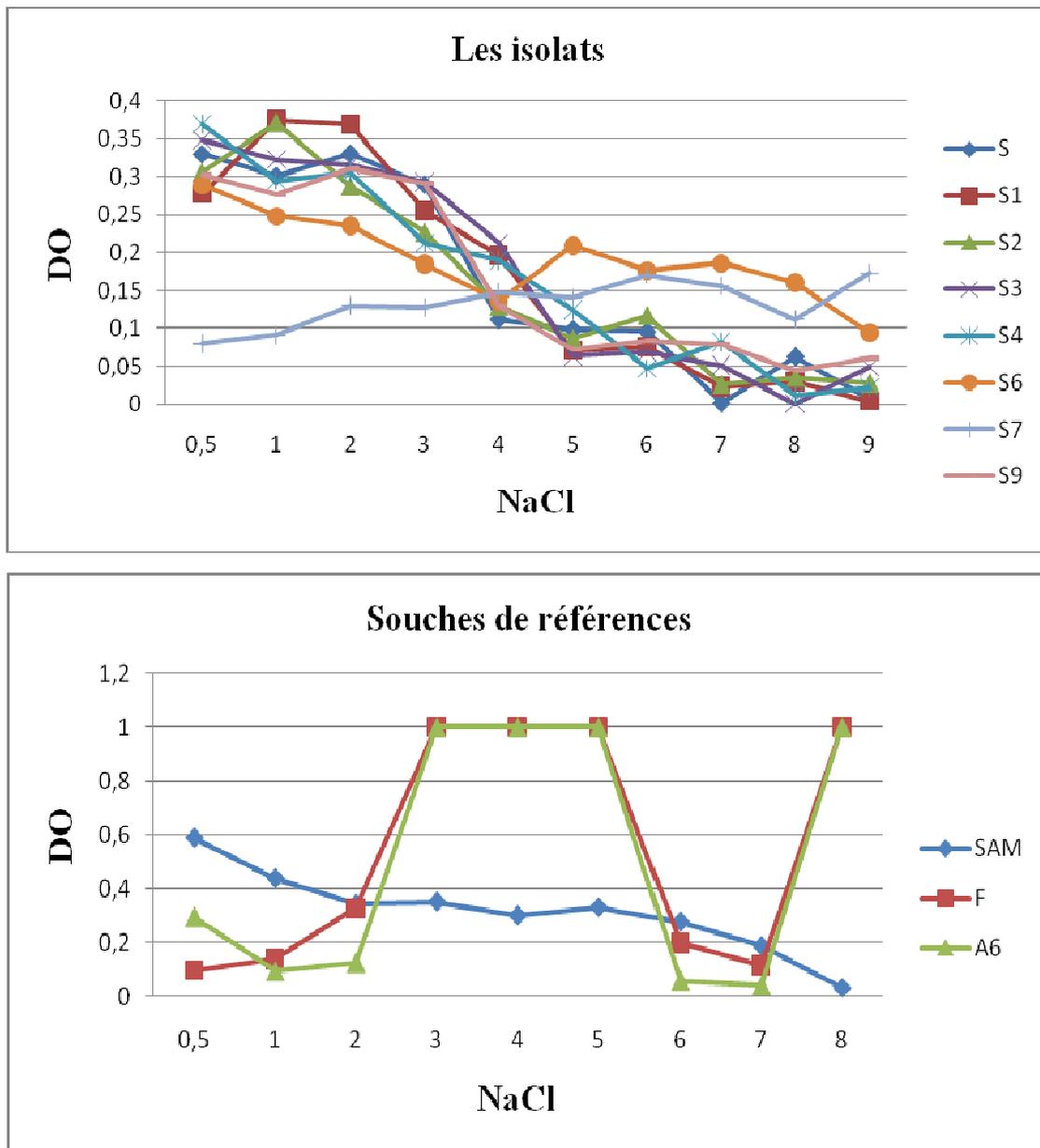


Figure 17 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes souches testées.

4-3-2-Température de croissance

Nos isolats et les souches de références sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 40°C avec un optimum de croissance entre 20°C et 30°C, ce qui observé chez les bactéries du genre *Rhizobium*. Toutefois à 50°C il n'y a aucune croissance. Ce qui indique que nos isolats sont Mesophiles.

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).

Tableau 06 : Température de croissance testée.

T° souches	4°C	20°C	30°C	40°C	50°C
S	+ (3j)	+	+	-	-
S1	+ (3j)	+	+	-	-
S2	+ (3j)	+	+	-	-
S3	+ (3j)	+	+	-	-
S4	+ (3j)	+	+	-	-
S6	+ (7j)	+	+	-	-
S7	+ (7j)	+	+	+	-
S9	+ (3j)	+	+	-	-
SAM	+ (5j)	+	+	+	-
F	+ (5j)	+	+	+	-
A6	+ (5j)	+	+	-	-

4-3-3-Effet de pH

La mesure de la densité optique montre que dans l'ensemble de nos souches tolèrent l'alcalinité et l'acidité (pH entre 4 et 10).

Un optimum de croissance de toutes les souches testées est remarqué à pH 4.

Les mêmes résultats ont été observés chez les souches de référence qui se sont tolérantes à l'acidité avec une croissance élevée à pH 4 et pH 6

Les travaux de Torche (2006) ont montré que la majorité des souches sont capables de pousser entre pH 4 et 10, avec un optimum de croissance se situant entre pH 6,5 et 7,5.

Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de la croissance des Rhizobiums est entre 6 et 7.

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

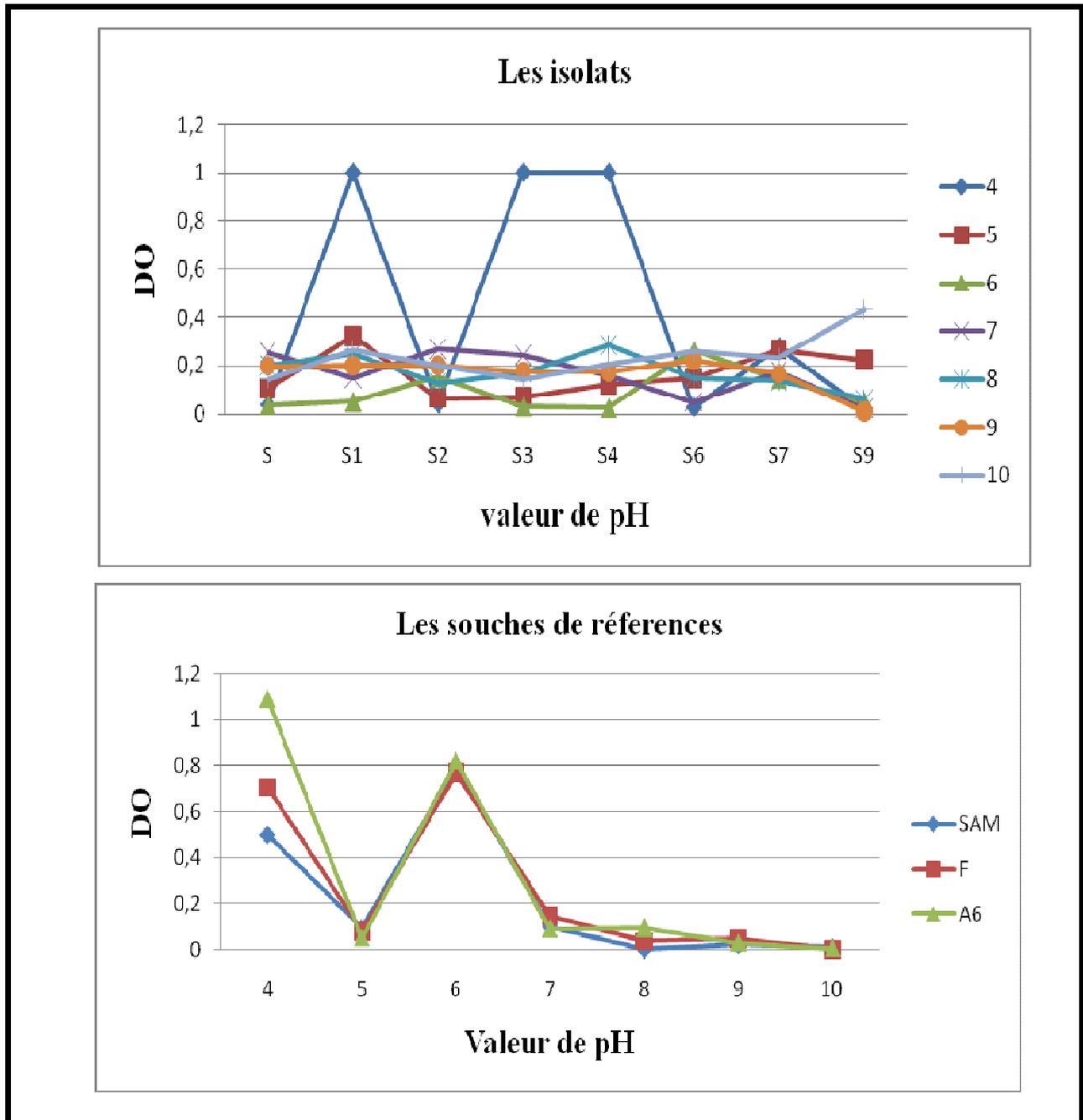


Figure 18 : Effet du PH sur toutes les souches testent.

4-4- Résistance aux antibiotiques

Les résultats obtenus révèlent une variabilité de la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis aux antibiotiques testés. (Amoxicilline, pénicilline, chloramphénicol et vancomycine).

Pour l'Amoxicilline les souches S, S2, S3, S9 et SAM sont résistantes alors que, les souches S4, S6, S7 sont sensibles et les souches S1, F et A6 sont intermédiaire.

Pour la pénicilline, les souches S2, S3, S4, SAM et A6 sont résistantes bien que, les souches S1, S9 et F sont intermédiaires sauf les souches S6 et S7 qui a montrée une sensibilité.

Pour le chloramphénicol les souches S, S1, S2, S4, S9 et SAM sont résistantes alors que, les souches S6, S7, F et A6 sont sensibles sauf la souche S3 qui est intermédiaire.

Pour le vancomycine les souches S, S2, S3 et SAM sont résistantes tandis que, les souches S6, S7 et A6 sont sensibles et les reste sont intermédiaires.

Nos résultats sont en accord avec Lakhal (2011) qui remarque dans ces travaux que la résistance a un antibiotique, comme l'Amoxicilline peut arriver à 90% des souches.

Alors que Hagedorn (1979) trouve que 50 isolats de *Rhizobium trifolii* ont résisté a de fortes concentrations de 11 antibiotiques (sur 15 testes, mais relativement sensibles au chloramphénicol, la streptomycine, la tétracycline, et la Vancomycine. les *Rhizobium* a croissance rapide et ceux a croissance lente, sont extrêmement résistants a l'acide naludixique (400µg. ml⁻¹) et la pénicilline (200µg. ml⁻¹) (Young et Chao, 1989).

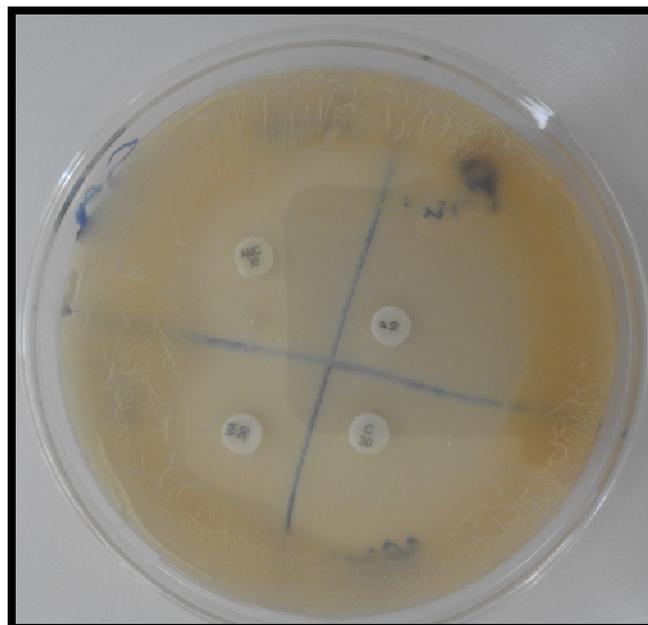


Figure 19 : résistance aux antibiotiques

Tableau 07 : Résultats des tests des antibiotiques.

Antibiotique souche	Amoxicilline	pénicilline	chloramphénicol	vancomycin
S	R	R	R	R
S1	I	I	R	I
S2	R	R	R	R
S3	R	R	I	R
S4	S	R	R	I
S6	S	S	S	S
S7	S	S	S	S
S9	R	I	R	I
SAM	R	R	R	R
F	I	I	S	I
A6	I	R	S	S

(R) : résistance aux antibiotiques

(S) : sensible aux antibiotiques

(I) : intermédiaire

Conclusion

Et

Perspective

Conclusion et perspective

Notre recherche a permis de mettre en évidence les différentes caractéristiques des souches et leurs diversités.

Cette recherche est basée sur une étude phénotypique et morphologique des souches isolées à partir du genre *Méllilotus* situé dans la région de Guelma. En présence des souches témoins de *Rhizobia*

Les aspects morphologique des isolats sur les différents milieux de culture, ainsi que l'examen microscopique attribuent que la majorité de nos isolats ont une morphologie des colonies proche du genre *Rhizobium*.

La croissance sur milieu YMA- rouge Congo montre que les souches absorbent rouge Congo mais avec une différence dans l'absorption.

En fonction de la vitesse de croissance sur le milieu YMA additionné de bleu de Bromothymol, les isolats peuvent être séparés en deux groupes : *Rhizobium* (Bactéries à croissance rapide) et *Bradyrhizobium* (bactéries à croissance lente), et la majorité de nos souches ont acidifié le milieu.

La croissance sur le milieu GPA-bromocrésol pourpre se fait avec acidification du milieu et modification du pH.

Le résultat du test nutritionnel montre que les isolats sont capables d'utiliser une grande variété de carbohydrates comme source de carbone.

La recherche des enzymes spécifiques tel que le nitrate réductase et l'uréase, démontre que nos isolats sont pourvus de ces deux enzymes.

Ainsi, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis des facteurs abiotiques, principalement l'NaCl, le pH et les températures extrêmes.

L'osmotolérance s'est révélée très importante pouvant aller jusqu'à 10% d'NaCl. Les souches ont été capables également de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 4 à 10. Quant à la température, la tolérance totale s'étend de 4°C à 40°C.

La résistance des souches aux différents antibiotiques testés a indiqué une grande résistance à la pénicilline et au chloramphénicol contre une sensibilité bien marquée pour les deux souches S6et S7.

A partir de ces données expérimentales et des résultats qui en découle et, en se basant sur les critères morpho-cultureux, nutritionnels et biochimiques, on peut inclure nos isolats dans la famille des rhizobia ou B.N.L. Par conséquent, nous n'avons pas pu ressortir une distinction appréciable afin de confirmer que nos isolats appartiennent au genre *Rhizobium* ou B.N.L à cause de l'absence de l'examen génotypique basé sur les techniques moléculaires. Seules ces techniques sont en mesure de préciser le genre, l'espèce et éventuellement le biovar.

Cependant, nous envisagerons d'entreprendre des travaux de recherches visant à l'application et à la vulgarisation des techniques mises au point.

Nos travaux futurs seront axés sur:

- L'étude de la compétitivité des souches introduites vis-à-vis d'autres microorganismes du sol ;
- La caractérisation phénotypique des isolats selon d'autres facteurs abiotiques et biotiques.
- L'exploitation de stimulation de croissance des souches aux déférente acides amines et vitamines.
- La détermination du profil des protéines totales des souches qui est réalisée par la technique d' SDS-PAGE.
- Une étude moléculaire par des techniques plus précises.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Agnoro M., 2008. Effet de l'inoculation avec "*bradyrhizobium japonicum*" et de l'apport de phosphore sur la productivité du soja (glycine max). Ingénieur agronome. Faculté des sciences agronomiques d'Abomey-Calavi, Bénin.

Benselama A., 2015. Réhabilitation de la culture du *lablab purpureus* L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique. Thèse de doctorat en interaction plante-microorganisme. Université d'Oran es-senia, Algérie.

Chabbi R., 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. poussant dans différents écosystème de L'Est algérien. Mémoire de Magister en Biotechnologie Végétale. Université Mentouri Constantine, Algérie.

Dhane Fitouri S., 2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du sulla du nord (*hedysarum coronarium* l.) et sélection de souches Rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique, Tunisie.

Duhoux, Émile, et Michel Nicole. 2004. *Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes.* Dunod.

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 en microbiologie et biologie moléculaire de l'université Mohammed V Agdal Rabat, Maroc.

Jean Figarella, Guy Leyral, Michèle Terret. 2007. Microbiologie générale et appliquée .

Ghalem M., 2009. Contribution à l'étude du développement de la culture du soja ; effets du sol et l'inoculation, rendement et caractérisation des bactéries associées. Thèse de magistère en biotechnologie. Université de d'Oran es-senia, Algérie.

Gharzouli R., 2013. Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides produits par l'espèce *Rhizobium sllae*. Thèse de doctorat en Génétique Moléculaire. Université de Constantine1, Algérie.

Grama borhane S., 2008. Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des *Rhizobia* de quelques légumineuses. Thèse de Magistère En génétique et amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie.

Guignard, Jean-Louis, et Pierre Potier. 2000. Biochimie végétale. Dunod

Guiraud J.P., 1998. – Microbiologie alimentaire. DUNOD.Paris.

Hagedorn C. (1979) Relationship of Antibiotic Resistance to Effectiveness in *Rhizobium trifolii* Populations. Soil Sci Soc Am J 43:921-925.

Hopkins, William G. 2003. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur. P 99-112.

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. p: 234-245.

Kassem M., Capellend I., GOUNOT A.M. (1985) : "Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficience de *Sinorhizobium meliloti*", Mircen J., 1, 63-75

Kouakou Romain F., 2011. Diversité génétique des *Rhizobia* associés à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.). Diplôme d'Agronomie Approfondie (**DAA**) en Agronomie Productions Végétales. Ecole supérieure d'agronomie de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Boigny de Yamoussoukro, centre de la Côte d'Ivoire.

Lekhal A., 2011. Effet de certains inducteurs de gènes nod (composés phénoliques) sur la croissance de rhizobium en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique. Thèse de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, Algérie.

Lissac L., 1997. *le melilot officinal, melilotus officinalis* (L) LAM. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de limoges.

Lucinski R, Polcyn W et Rotayczak L., 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimia Polonia*.49 (2): 537-546.

Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002. - Phenotypic characterization of *rhizobia* isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22 : 321–329

Madigan M et Martink J., 2007. Brock Biologie des microorganismes 11e édition. Edition. Person Education France. P 599-601, 676-681.

Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., 2004: Botanique: Biologie et physiologie végétales. Edition Maloine Paris France. P 216-219.

Morot-Gaudry, Jean-François. 1997. Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Editions Quae. P

Nentwig, Wolfgang, Sven Bacher, et Roland Brandl. 2009. Écologie: manuel de synthèse. Vuibert.

P. Quezel, S. Santa ., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du centr national de la recherche scientifique 15, quabanatole France –paris 7.

Perry J.J, Stalex J.T et Lory S., 2004. Microbiologie cours et questions de révision. Edition Person Education France. P 617-634.

Pidello, Alejandro. 2014. Principes de chimie redox en écologie microbienne. Editions Quae.

Raven, Peter H., Susan E. Eichhorn, et Ray F. Evert. 2014. Biologie végétale. De Boeck Supérieur.

Heller, René, Robert Esnault, et Claude Lance. 1998. *Physiologie végétale: Nutrition*. Masson.

Riah N., 2001. Etude de la symbiose *Rhizobium -pois fourrager (Pisum arvens L)*. Essais de production d'inoculum et inoculation au champ .Thèse de magister : Biochimie et Microbiologie Appliquée .Université Mentouri Constantine, Algérie.

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

Saoudi M., 2008. Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie.

Sebihi F., 2008. Les Bactéries Nodulants les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie.

Somasegaran P et Hoben H.J., 1994. Handbook for rhizobia: methods in legumes- *Rhizobium* Technology. Springer verlag. ISBN:0-387-94134-7.

Sousou S., 2013. Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium* .these de doctorat en Microbiologie, Parasitologie / Agriculture Durable. Institut supérieur agronomique de chott meriam. Université de Sousse, Tunis.

Suty, Lydie. 2015. *Les végétaux: Des symbioses pour mieux vivre*. Editions Quae.

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulants les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.

VerniéT., 2008. Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat en Biosciences Végétales. Université Toulouse III, Paul Sabatier.

Yann P., 2006.- Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium* légumineuses. Master Recherche. Microorganisme du génome aux interactions avec l'hôte. Université de Paul Sabatier.Toulouse III.

Young C.C. and Chao C.C. (1989): Intrinsic antibiotic resistance and competition in fast and slow-growing soybean rhizobia on a hybrid of Asian and US cultivars. *Biol Fertil Soils* 8:66–70.

Zahran H, Abdel-Fattah M, Ahmad M.S et Zaki A.Y., 2003. Polyphasic taxonomy of symbiotic rhizobia from wild leguminous plants growing in Egypt. *Folia Microbial.* 48:510-520.

Zahran H.H., 1999. -*Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*sp. 63(4) : 968-989

Zahran H.H., 2001. *Rhizobia* from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotechnol.* 91(2-3): 143-153.

Zerhari K, Aurag J, Khbaya B, Khrchaf D et Filali-Malouf A., 2000. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett.Appl. Microbiol.* 30, 351-347.

Web graphie

- (A): http://www.ecosociosystemes.fr/cycle_azote.html. « Cycle de l'azote ». Consulté le 02.03.2016.
- (B): https://www.google.com/search?q=cycle+d%27azote&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwja6IqboP3MAhVDPxQKHdJeDREQ_AUIBygB&biw=1366&bih=659#imgrc=B3DfjLLgSZQiiM%3A. « cycle d'azote - Recherche Google. ». Consulté le 15.03.2016.
- (D): [http://www.bdesciences.com/nolaj/SVS/L3/Semestre%20VI/Reponses%20des%20Plantes%20a%20l%20Environnement/Cours/Krys3000%20\(2010\)/IV%20-%20La%20symbiose%20Rhizobium-Legumineuse.pdf](http://www.bdesciences.com/nolaj/SVS/L3/Semestre%20VI/Reponses%20des%20Plantes%20a%20l%20Environnement/Cours/Krys3000%20(2010)/IV%20-%20La%20symbiose%20Rhizobium-Legumineuse.pdf). « (MicrosoftWord-IV-Lasymbiose Rhizobium-l\351gumineuse) - IV - La symbiose Rhizobium-Legumineuse.pdf ». Consulté le 12.04.2016.
- (E): <http://www.laboratoires-fenioux.com/melilot-G371/fr>: « Laboratoires Fenioux - Compléments alimentaires □: Mélilot (*Melilotus officinalis*) - Site officiel ». Consulté le 12.04.2016.
- (F): <http://www.plantes.ca/feuillage/famille/melilotus.html> : 'Mélilot - Melilotus' [accessed 12.04.2016].
- (G): <http://www.jeantosti.com/Fleurs/melilot.htm> : 'Fleurs Du Roussillon' [accessed 12.04.2016].
- (H): <http://www.mauvaisesherbes.org/t681-melilot-melilotus-officinalis>: « Mélilot-Melilotus officinalis ». Consulté le 18.04.2016.
- (I): <http://www.altheaprovence.com/blog/melilot-melilotus-officinalis/> « Mélilot (Melilotus officinalis) ». *AltheaProvence*. 22.04.2016.

Annexes

Annexe 1:

Milieux de culture et solutions utilisés

Composition de milieu YMB (Yeast mannitol broth) en g/l.

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml

PH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA (Yeast mannitol agar) en g/l.

YMB	1000 ml
Agar	18
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+ rouge Congo en g/l

YMB 1000 ml

Solution stock de rouge Congo 10 ml

Agar 18

PH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 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 5 ml

Agar 15

PH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

Composition de milieu GPA (Glucose peptone agar) + pourpre de bromocrésol en g/l.

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

Composition de milieu nitrate réductase en g/l.

Nitrate	20
Eau distillée	1000ml
PH	7.2

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 2 :

Les résultats de la mesure de la densité optique des différents tests.

1-Source de carbone :

Sucre souche	Glucose	Dextrine	Amidon	Galactose	Sucrose
S	0,037	0,116	0,201	0,022	0,879
S1	0,283	0,071	0,034	0,06	0,012
S2	0,304	0,206	0,157	0,418	1
S3	0,242	1	0,09	0,066	0,111
S4	0,292	0,077	0,611	0,105	0,807
S6	0,367	0,209	0,303	0,445	1
S7	0,29	0,048	0,387	0,148	0,256
S9	0,347	0,256	0,582	0,422	1
SAM	0,022	0,264	0,049	0,016	0,03
F	0,07	1	0,025	0,06	0,044
A6	0,093	0,109	0,244	0,018	0,015

2-Tolérance au NaCl :

NaCl souche	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S	0,330	0,301	0,331	0,209	0,112	0,099	0,096	0,002	0,063	0,007	0,046
S1	0,277	0,375	0,370	0,255	0,196	0,071	0,075	0,023	0,030	0,004	0,044
S2	0,306	0,372	0,288	0,227	0,129	0,087	0,117	0,026	0,035	0,028	0,061
S3	0,348	0,323	0,316	0,293	0,212	0,064	0,069	0,051	0,001	0,049	0,031
S4	0,370	0,295	0,306	0,212	0,190	0,124	0,047	0,082	0,011	0,022	0,024
S6	0,289	0,248	0,236	0,185	0,136	0,209	0,176	0,186	0,160	0,094	0,052
S7	0,080	0,091	0,130	0,128	0,148	0,140	0,171	0,156	0,112	0,173	0,023
S9	0,303	0,276	0,311	0,291	0,129	0,072	0,084	0,078	0,044	0,061	0,016
SAM	0,587	0,438	0,342	0,351	0,300	0,330	0,277	0,187	0,031	0,035	0,012
F	0,097	0,138	0,327	1	1	1	0,197	0,115	1	0,080	1
A6	0,296	0,093	0,125	1	1	1	0,058	0,040	1	0,078	0,227

3- Effet du pH:

pH souche	4	5	6	7	8	9	10
S	0,037	0,106	0,037	0,254	0,202	0,199	0,146
S1	1	0,325	0,051	0,15	0,248	0,201	0,266
S2	0,041	0,066	0,152	0,271	0,13	0,203	0,2
S3	1	0,07	0,031	0,244	0,172	0,177	0,146
S4	1	0,12	0,026	0,162	0,286	0,175	0,208
S6	0,027	0,15	0,263	0,05	0,148	0,221	0,259
S7	0,277	0,267	0,146	0,174	0,139	0,168	0,236
S9	0,024	0,225	0,049	0,024	0,062	0,012	0,435
SAM	0,498	0,093	0,798	0,102	0,003	0,02	0,011
F	0,704	0,081	0,768	0,148	0,036	0,049	0,003
A6	1,087	0,05	0,821	0,091	0,094	0,029	0,004

Nom : Benkirat Denna	date de soutenance /06/2016
Prénoms : Ismahane Widad	
TITRE : isolement et caractérisation des bactéries nodulants la plante légumineuse Mellilotus situées dans la région de Guelma	
Nature du DIPLOME : master	
Résumé	
<p>Le but de ce travail est de caractériser les bactéries isolées à partir des nodules de la plante légumineuses <i>Mellilotus officinalis</i>, localisée dans la région de Guelma (l'Est de l'Algérie). Les isolats sont identifiés par une étude morphologique suivie d'une série des testes phénotypiques comprenant des tests nutritionnels, effet des facteurs abiotiques, recherche des enzymes spécifiques et détermination de la sensibilité et la résistance aux antibiotiques. Cette étude est faite en présence de souches de référence de rhizobia.</p> <p>Les résultats obtenus montrent que nos isolats ont une description comparable à celle de <i>Rhizobium</i> et certaines souches sont révélées comme des <i>Bradyrhizobiumes</i>, très résistantes aux antibiotiques.</p>	
Mots clés : <i>Rhizobium</i> , <i>Mellilotus</i> , légumineuses, symbiose, nodule.	
Directeur de la recherche : M ^{me} Torche Esma M.C.B l'université de Guelma	
Membres de jury :	
Président (e) : Mr Rouabhia Kamel M.A.A	Université de Guelma
Examineur : Mr Gueroui Yacine M.A.B	Université de Guelma