

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mohamed Khider Biskra

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Réf: .../....

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse
fourragère, *Astragalus gombo* dans la région El Hadjeb (El Choucha)-
Biskra

Présenté par :

Bouguesba Afaf

Devant le jury :

Président : M^{me} Arrigue Soulaf Farida

Promoteur : M^{me} Mokrani Djamila

Examineur : Mr Guemmaz Fateh

Année Universitaire : 2013/ 2014

Remerciement

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail

Je remercie

Mon encadreur de mémoire, madame **Mokrani Djamila**, pour sa confiance, sa patience et ses précieux conseils qu'il m'a accordés tout le long de ce travail.

Monsieur **Guemmaz Fateh** et madame **Arrigue Soulaf Farida** pour avoir accepté de jurer ce travail.

Mes vifs remerciements à tous les enseignants du département des sciences de la nature et de la vie, et aussi à l'ensemble du personnel de l'Université Mohammed Khider- Biskra, pour leur collaboration, encouragement et précieuses suggestions.

Je tiens à remercier l'étudiant **Achour Hamza** pour leur aide de trouver les nodules *d'Astragalus gombo* de ce travail à l'année passée .

A tous les techniciens du laboratoire de la Faculté.

Bien sur à tous mes collègues pour ses aides, leur sympathie et leur soutien moral au cours de ces années.

Que tous ceux, que je n'ai pas nommés, et qui de prêt ou loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je remercie Dieu le tout puissant pour la santé, la patience et la force d'étudier pour que je puisse en arriver à ce niveau.

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents et tout ce qu'ils présentent pour moi, en signe de reconnaissance aux sacrifices qu'ils ont consentis pour moi depuis ma naissance.

A tout mes famille : Bouguesba et Berrtima .

A mon chère sœur : Khaoula

A mes chères frères :Sid Ali , Achour , Lakhader .

A mes chères amies: Sabrina, Saliha, Safa ,Hanan, Khadra, Karima, Wafa ,Nesrine, Fatima zohra , Zohra, Razika, Wahiba, Lynda M , Bakhta ,Imane , Besma Fella , Zahira

Un spéciale dédicace à : Suide Sabrine

A tous mes collègues d'étude sans exception : Azmi, Hanane, wasila, Fatima, Merieme

A toute ma promotion de Biologie

Je te dis merci et merci tous.

A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon cœur et de ma pensée.

AFAF

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

Liste des abréviations

Introduction générale

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. Interaction plante-microorganismes.....	3
I.1. Le cycle de l'azote.....	3
I.2. La fixation de l'azote.....	4
I.3. Bactéries fixatrices d'azote.....	5
I.4. La réaction globale de la fixation de l'azote.....	5
I.5. La nitrogénase bactérienne.....	6
I.5.1. Mécanisme moléculaire de la fixation.....	7
I.6. La symbiose.....	7
I.7. Génétique de la symbiose et de la nodulation	8
I.7.1. Les substances responsables de la nodulation.....	8
II. nodulation.....	9
A. Les étapes de la nodulation.....	9
II. Les légumineuses.....	12
II.2. Classification	12

II.3. Importance des légumineuses.....	13
II.4.Distribution Morphologie de la plante.....	14
III. Le microsymbiont : Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L).....	16
III.1. Classification actuelle des <i>Rhizobia</i>	16

Chapitre II :Matériels et Méthodes

I. Isolement des bactéries à partir des nodules d' <i>Astragalus gombo</i>	23
I.1.Collecte des nodules.....	23
I.2.Conservation des nodules.....	23
I.3.Isolement des souches à partir des nodules.....	24
I.3.1.Stérilisation des nodules.....	25
I.3.2.Ecrasement des nodules.....	25
I.3.3. Isolement des souches.....	26
II-Caractères cultureux.....	27
II-1- Principaux milieux de culture utilisés.....	27
II-2- Purification des isolats.....	28
II-3-Examens microscopiques.....	28
II-4-Examen de la mobilité.....	28
II-5-Conservation des souches.....	28
III- Caractérisation phénotypique des isolats.....	29
III.1. Tests nutritionnels.....	29
III.1.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone.....	29
III.2. Tests physiologiques.....	30

II.2.1.Effet de la température.....	30
II.2.2.Effet de pH.....	30
III.3. Tests biochimiques.....	30
II.3.1. Réduction des nitrates.....	30
III.3.2. Activité pectinolytique.....	31
II.3.3. Activité cellulolytique.....	31

Chapitre III :Résultats et discussion

I.Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats.....	32
I.1.Croissance des isolats sur YMA.....	33
I.2. Croissance sur YMA + Rouge Congo.....	33
I.3. Examen de la mobilité.....	34
I.4.Examens microscopiques par Coloration de Gram	35
I.5. La vitesse de croissance.....	35
II. Test nutritionnel.....	36
II.1. Utilisation de la source de carbone.....	36
III. Tests physiologiques.....	37
III.1. Effet de la température.....	37
III.2. Effet de pH	38
IV. Tests biochimiques.....	39
IV.1. Réduction des nitrates.....	39
IV.2. Activité pectinolytique.....	41
IV.3. Activité cellulosique.....	41
Conclusion générale.....	43

Références Bibliographiques

Annexes

Résumé

Listes des figures

Figure 1 : Le cycle de l'azote	03
Figure 2: Mécanismes biochimiques impliqués dans la fixation de l'azote	07
Figure 3 : Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs Nod.....	09
Figure 4 : Développement des nodules sur les racines.....	12
Figure 5 : Localisation géographique des zones de prélèvement.....	23
Figure 6 : Conservation des nodules sous CaCl_2	24
Figure 7 : Procédures d'isolement comme employées par	25
Figure 8 : Les nodules sont écrasés dans une boîte de pétri	26
Figure 9: Ensemencement par la technique des quatre cadrans.....	27
Figure 10 : Conservation des souches sur milieux inclinés.....	29
Figure 11: Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats.....	37
Figure 12: Effet du pH.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification actuelle des rhizobia	16
Tableau 2 : les souches et les souches de références utilisées dans cette étude	32
Tableau 3 : Réduction des nitrates.....	40
Tableau 4 : Activité pectinolytique	41
Tableau 5 : Activité cellulolytique	42

Liste des photos

Photo 1 : <i>Astragalus gombo</i>	15
Photo 2 : Les différents milieux	30
Photo 3 : Aspect des colonies sur YMA (isolat R06).....	33
Photo 4 : Aspect des colonies sur YMA + Rouge Congo (isolat R06).....	34
Photo 5 : Examen de la mobilité	34
Photo 6 : Coloration de Gram des isolats.....	35
Photo 7 : Aspect des colonies sur GPA+BcP (R06).....	36
Photo 8 : Aspect des colonies sur YMA+BTB(R06)	36
Photo 9 : Effet de la température 20°C.....	38
Photo 10 : Effet de la température 28°C.....	38
Photo 11 : Effet de la température 04°C.....	38
Photo 12 : Effet de la température 37°C.....	38
Photo 13 : Réduction des nitrates (isolats S04 S05, R02, R06, R08).....	41
Photo 14 : Activité pectinolytique (S05, R06).....	41
Photo 15 : Activité cellulolytique (R06).....	42

Listes d'abréviation

(-) : négative.

(+) : positive.

ADN : acide désoxynucléique.

ADP: Adénine diphosphate.

Ast : Astragalus gombo.

ATP: Adenine triphosphate.

BcP : Pourpre de Bromocrésol.

BNL : bactéries nodulant les Légumineuses.

CaCl₂ : Chlorure de calcium.

G : Guanine.

GPA : Glucose Peptone Agar .

Gram(-) : Gram négatif.

H₂: gaz d'Hydrogène.

H₂O : l'eau.

LPS :Lipopolysaccharide.

N : L'azote.

N₂ : L'azote atmosphérique.

N₂O : oxyde d'azote.

NaCl :Chlorure de Sodium.

NH₃ : L'ammoniac.

NH₄⁺: ion d'ammonium.

NO₃⁻ : Nitrates.

nod : le gène de nodulation.

PH : Potentiel de l'hydrogène .

YMA : Yeast Mannitol Agar.

YMB : Yeast Mannitol Broth

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Dans les pays du pourtour du bassin Méditerranéen, les légumineuses occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elles constituent une source d'alimentation pour l'homme (légumineuses à graines, pois chiche, haricot, lentille ...) et fourrage pour les animaux (luzernes, trèfles, sulla...) (**Zakhia , 2004**) .

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

Elles ont une particularité biologique qui leur permet de s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiacées), pour former des organes symbiotiques « les nodosités » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par les plantes (**Mylona et al .,1995**).

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire du globe ; les plus connues et les mieux étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses (**Domergue ,2006**).

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux (**Sebihi , 2008**) .

Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. En retour, les bactéries tirent profit de l'interaction symbiotique en obtenant des hydrates de carbone produits par la plante pendant la photosynthèse (**El Hilali, 2006**).

Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL), 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**).

Dans l'objectif d'étudier les bactéries associées aux nodules des racines des espèces de légumineuses du genre *Astragalus* (particulièrement *Astragalus gombo*), les isolats sont caractérisés

par une étude phénotypique (aspects morpho-cultureux), tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels.

Notre étude est portée sur la fixation symbiotique de l'azote, en utilisant une légumineuse fourragère *Astragalus gombo*.

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- Isolement des Rhizobia à partir des nodosités.
- Etudes morphologique et microscopique des isolats.
- Test nutritionnel (Utilisation des sources de carbone).
- Tests physiologiques (effet de pH, effet de température).
- Tests biochimiques (réduction de nitrate, activité pectinolytique, activité cellulolytique).

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Interaction plantes –microorganismes

I.1. Le cycle de l'azote :

Tous les organismes vivants ont besoin d'azote car c'est un élément essentiel pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques (**PERRY et al., 2004**).

Le principal réservoir d'azote est l'atmosphère ;l'azote gazeux (N_2) constitue en fait quelque 78% de l'atmosphère (**RAVEN et al., 2000**).

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 (**Figure 1**) (**HOPKINS, 2003**). les trois principales étapes de ce cycle sont : l'ammonification ,la nitrification et l'assimilation (**RAVEN et al., 2007**).

les plantes ont besoin d'azote ,mais ne peuvent absorber l'azote gazeux (N_2) de l'air. En effet, l'azote est absorbé sous forme de nitrates (NO_3^-) et aussi d'ammonium (NH_4^+) (**NABORS, 2008**) .

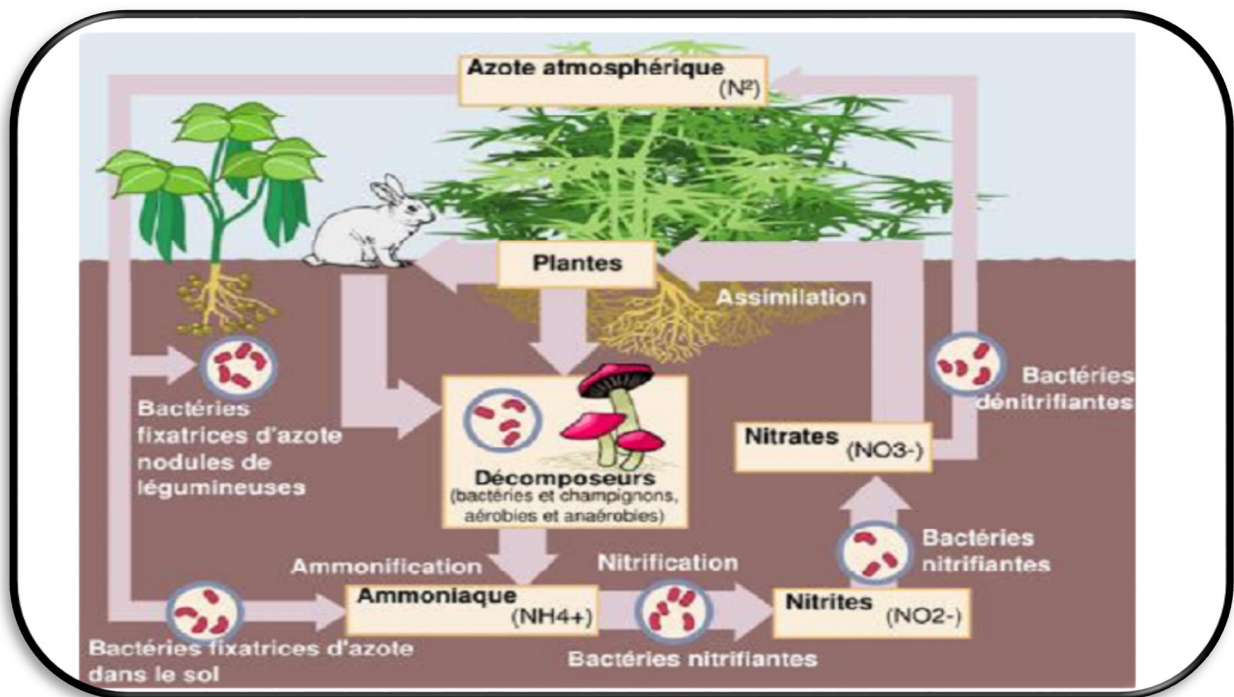


Figure1:Le cycle de l'azote (**PERET, 2007**).

I-2. La fixation de l'azote

La réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac s'appelle la **fixation de l'azote**, les cellules eucaryotes sont totalement dépourvues de cette propriété (**PRESCOTT, 2003**). Seuls les organismes procaryotes sont capables de fixer l'azote (**PERRY et al., 2004**).

- **La fixation symbiotique de l'azote**

La plus grande partie de l'azote de la biosphère (79%) se trouve dans l'atmosphère (**HAYNES, 1986 ., FOTH, 1990**). La fixation d'azote est le principal moyen naturel par lequel l'azote atmosphérique est ajouté au sol.

Mais seul un nombre réduit de genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère. Par la symbiose entre les bactéries réductrices de l'azote atmosphérique, une grande partie des légumineuses utilisent principalement l'azote provenant de l'atmosphère. A l'échelle mondiale, la fixation biologique annuelle de N_2 est estimée au double de l'utilisation mondiale des engrais. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (**NEWTON, 1998**).

- **La fixation biologique de l'azote**

C'est le processus de fixation d'azote moléculaire de l'air à lieu dans le nodule (**DUPHOX et NICOLE, 2004**).

La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes , simplement parcequ 'ils possèdent un complexe enzymatique , nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (**HOPKINS, 2003**). La fixation biologique de N_2 est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. 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 . En Absence de fertilisation, la fixation de N_2 est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (**ROGER et al., 1996**).

I-3. Les bactéries fixatrices d'azote

La fixation de l'azote est réalisée par des procaryotes aérobies ou anaérobies et n'existe pas chez les eucaryotes (**PRESCOTT et al., 2003**).

- **Les fixateurs symbiotiques**

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, symbiotiques 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 (**DENARIE, 2000**).

- **Les fixateurs libres**

Il existe des bactéries qui vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, soit librement, soit en symbiose avec d'autres bactéries. Ce sont principalement:

- Des bactéries **aérobies** : *Azotobacter*, *Azomonas* ;
- Des bactéries **anaérobies** : *Clostridium*,... (**BENAHMED, 2010**)

La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (**TORCHE, 2006**).

I-4. La réaction globale de la fixation de l'azote

Le processus de la fixation biologique de N_2 consiste dans la réduction de l'azote atmosphérique (N_2) sous la forme ammoniacale, forme utilisable par la plante :



Il y a simultanément réduction d'au moins deux protons en hydrogène :



La réaction globale est donc la suivante :



En fait n peut varier de 2 à 9 (WITTY et MINCHIN, 1988). On admet souvent que $n = 2$;

l'équation globale devient alors :



I-5. La nitrogénase bactérienne

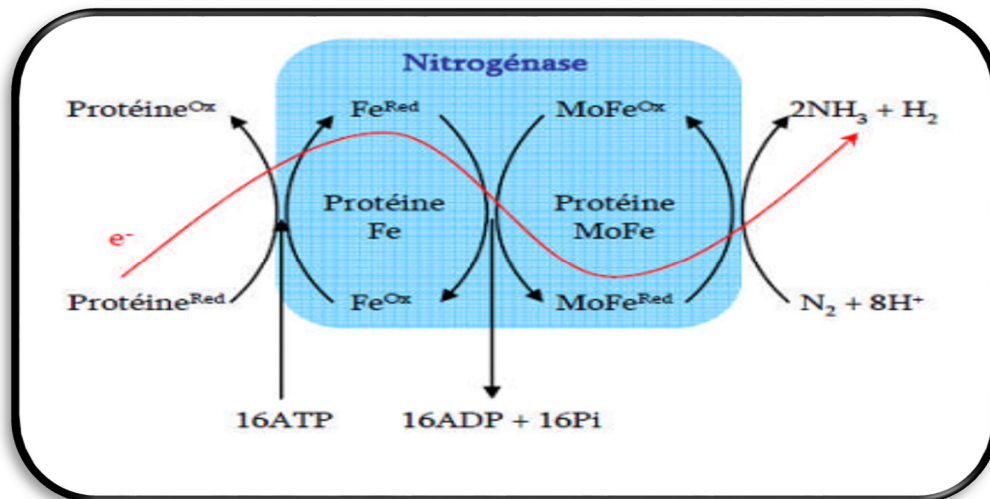
La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (REES et HOWARD, 2000).

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 nitrogénases connues sont construites sur le même modèle et ont des caractères communs (PELMONT, 1995).

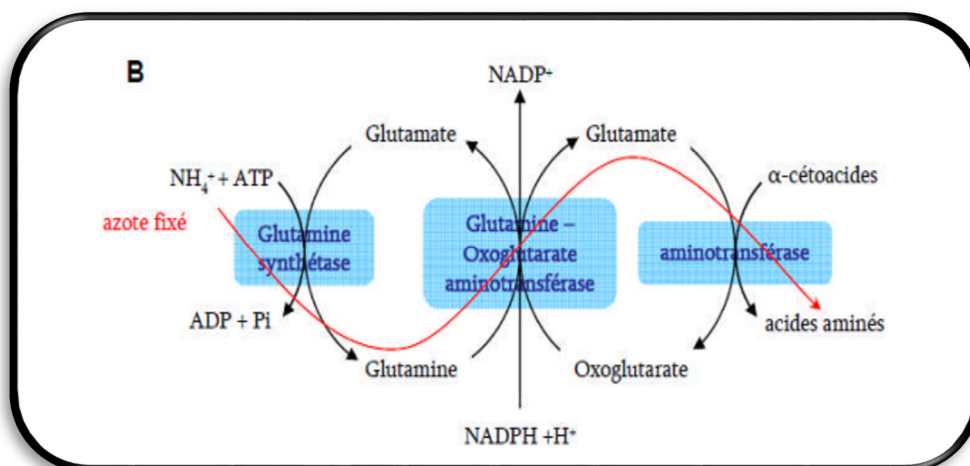
La nitrogénase est un complexe protéique multi-mérique composé de deux protéines de taille différente (Hopkins, 2003) nommées dinitrogénase ou protéine I (tétramère de 220 KDa), est constituée de deux sous-unités α et deux sous-unités β , et dinitrogénase réductase ou protéine II (homodimère de 64 KDa) (MADIGAN et al., 2007; DUPHOX 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).

I-5-1. 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^+) (**Figure 2**). L'équation de la réaction chimique est:



A- mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique a 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 .

Figure2: Mécanismes biochimiques impliqués dans la fixation de l'azote (**CHABIE, 2010**).

I-6. La symbiose

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. La symbiose est une association de deux ou plusieurs organismes différents, qui leur permet de vivre avec des avantages pour chacun.

Ce type de relation vitale a été observé pour la première fois en 1872 par Reinke (**PEERY, 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 (**LEFEVRE, 2004**).

I-7. Génétique de la symbiose et de la nodulation

Certaines bactéries fixant l'azote vivent en liberté, mais la plupart des espèces symbiotiques comme le genre *Rhizobium* vivent au sein de nodosités spécialisées sur les racines de légumineuses. La formation de ces nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante (**MICHELLE, 2006**).

I-7-1. Les substances responsables de la nodulation

a- Les flavonoïdes

Ils se trouvent chez les végétaux, où ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les bactéries du groupe *Rhizobium*. Ces exsudats qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, qui en retour relâche des lipopolysaccharides (LPS) provenant de sa membrane. Ces LPS ont une structure antigénique spécifique, reconnue par la plante, la bactérie peut lyser la paroi de la cellule végétale et s'y introduire. Il y a formation d'un cordon infectieux, qui se ramifie au fur et à mesure de son passage dans d'autres cellules végétales. Dans le cytoplasme, les bactéries ne sont pas libres, elles sont regroupées dans des vésicules de séquestration. Si la cellule est diploïde, elle se nécrose et meurt. Si elle est tétraploïde en revanche, il y a formation d'un nodule (**MICHELLE, 2006**).

b- Les facteurs Nod

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia (**Figure 3**), est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de

facteurs Nod sont des molécules lipochitooligosaccharidiques (TEREFEWORK, 2002).

Ces facteurs à des concentrations minimales 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 (DEBELLE et *al.*, 2001).

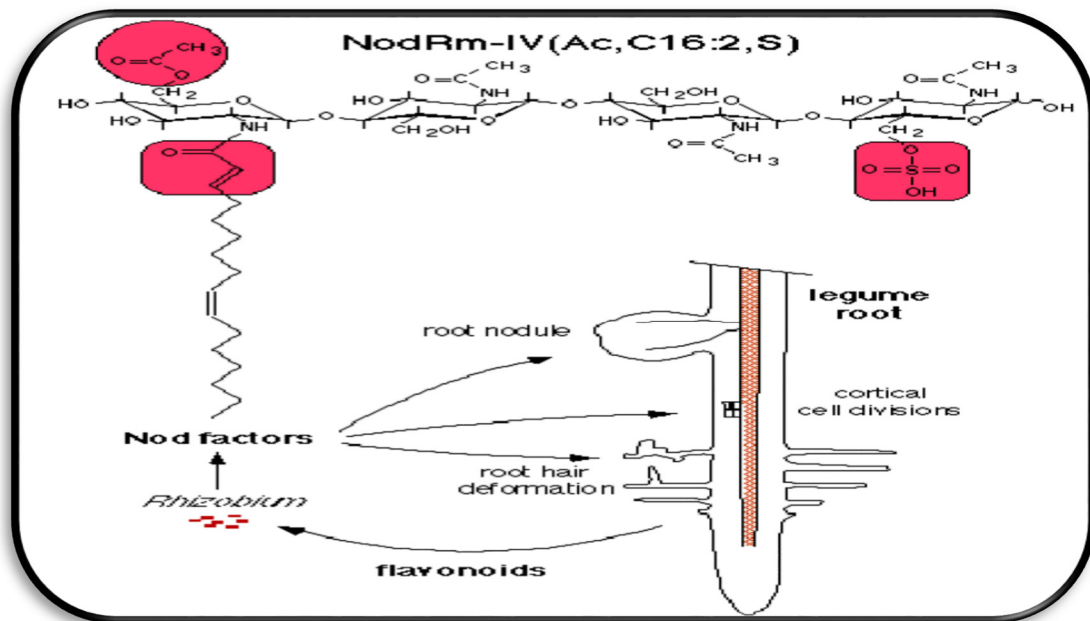


Figure3: Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs Nod (DELEGLISE, 2001).

II. La nodulation

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 (Figure 4) (BREWIN et *al.*, 1992) .

A-Les étapes de la nodulation

a-1. Préinfection

Les *rhizobia* sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée. Les germes

sont attirés par des produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes exsudés par les racines . L'interaction est spécifique. 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**).

c-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. (**MIKLASHEVICH 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.

a-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**). 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 (**HOPOKINS, 2003**).

a-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 (**BREWEN ET al ., 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 plasmlemme (**CHABIE, 2010**). 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 .

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 (**DUPHOX 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.

a-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 (**HOPKINS , 2003**) . Les *rhizbiums* se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote , nommées bactéroïdes (**HOPKINS , 2003 ; RAVEN et al., 2007**). La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses modification métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'un autres facteur dont l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale: la fixation d'azote (**HOPKINS , 2003**).

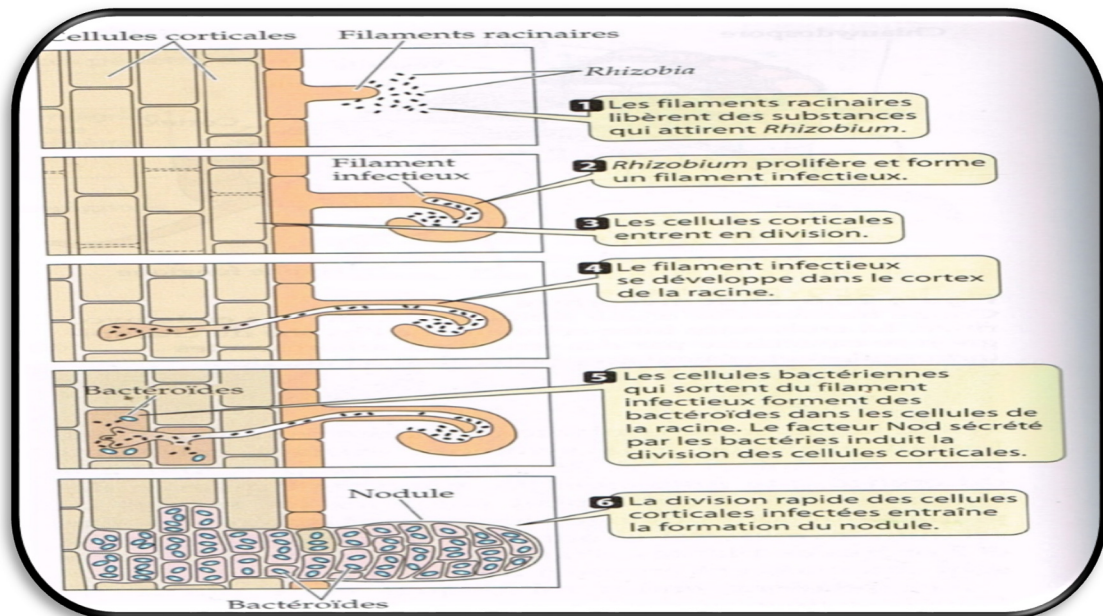


Figure 4: Développement des nodules sur les racines (PERRY et *al.* , 2004).

II- Les légumineuses :

II-1. Généralités

Cette famille, l'une des plus importantes du règne végétal est caractérisée par un ovaire formé d'un seul carpelle qui se transforme en un fruit d'un type particulier, appelé autrefois légume et que l'on désigne plutôt actuellement sous le nom de gousse. C'est un fruit sec, déhiscent par deux fentes longitudinales dont l'une suit le bord ventral (le long duquel sont insérées les graines) et l'autre la nervure dorsale (OZENDA, 1991). 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 (CHABIE, 2009).

II-2. Classification

Actuellement on considère l'existence de trois grands sous groupes, généralement considérés comme des sous-familles et qui ont pu être traités aussi en familles indépendantes :

1-Les Mimosoideae :

ont de très nombreuses petites fleurs en grappes serrées à nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales ; les fleurs sont symétriques. Sont en majorité des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales (SEBIHI, 2008) . Cette sous-famille comprend 40 genres et 2500 espèces (BOTINEAU , 2010) .

2- Les Caesalpinioideae :

ont habituellement des fleurs comme des papillons et à étamines unies , sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales (SEBIHI, 2008). comprenant 150 genres et 2700 espèces (BOTINEAU, 2010). Ce sous-groupe apparait paraphylétique ,avec certains genre proches des Mimosoideae et d'autres présentant des affinités avec les Faboideae .

3- Les Papilionaceae ou Fabaceae :

Elles ont des fleurs en forme de papillon avec un pétale supérieur appelé étendard, deux pétales latéraux ou ailes et une carène formée par deux pétales inférieurs unis ; les sépales au nombre de 5 sont soudés en tube ; les 10 étamines sont habituellement incluses dans les pétales, unies par leurs filets en un tube qui entoure le pistil, ou avec une étamine (SEBIHI, 2008).

représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12615 espèces, classées en 31 tribus, se différenciant sur des critères parfois chimiques (BOTINEAU, 2010) .

II-3. Importance des légumineuses

Cette famille à un grand intérêt pour l'homme qui utilise ses produits comme aliments, gommes, teintures, résines, huiles et nombreux bois de construction. Aussi certaines espèces de cette famille peuvent contracter une symbiose avec une bactérie du genre *Rhizobium*, pour permettre un accès privilégié à l'azote de l'air.

Ces plantes ont donc un rôle améliorateur des sols, en plus d'un intérêt alimentaire. L'intérêt alimentaire est évident : cette famille représente le 2ème rang mondial (derrière les On peut citer le soja, les lentilles, les haricots et autres fèves...

Quelques espèces ne sont pas dénuées de toxicité (comme par exemple les fèves de Calabar). L'indigo est fourni par une espèce de légumineuses (intérêt en teinture).On

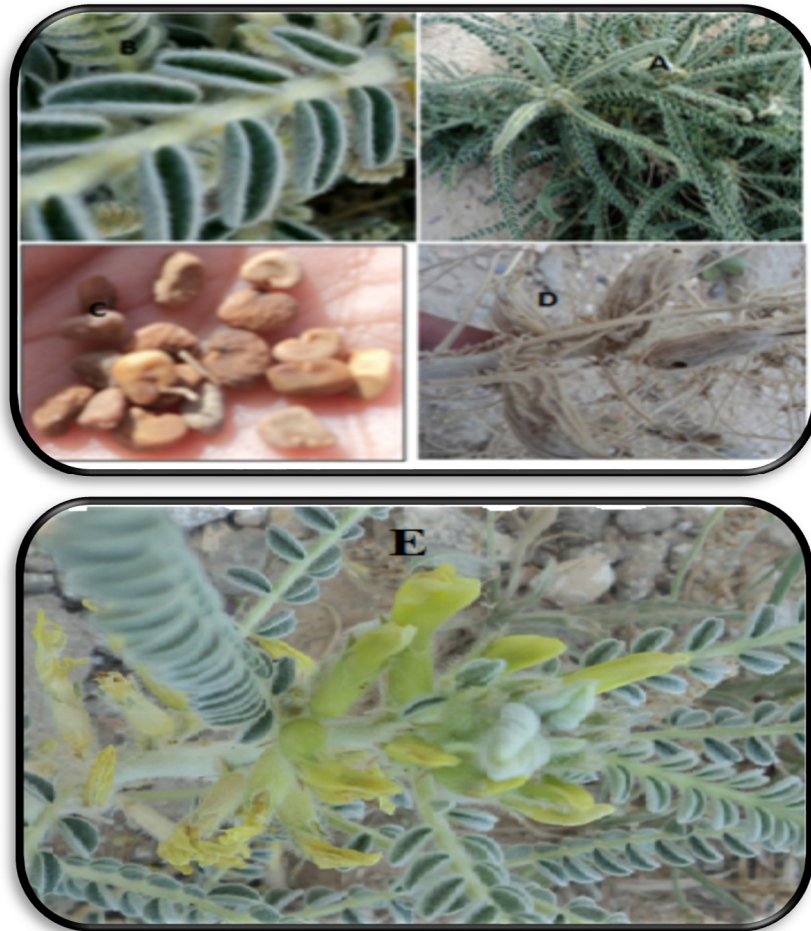
peut noter aussi l'usage comme insecticide : le roténone, insecticide naturel obtenu à partir de plantes du genre Derris, est le seul utilisable en agriculture biologique.

II-4. Description morphologique de la plante

Plante vigoureuse au port dressé de 10 à 50 cm de haut .

Les tiges sont bien développées d'après **Photos 1**.

- **Les feuilles** : Sont de grandes taille de couleur vert claire, avec de très nombreuses petites folioles . Les pétioles robustes perdant leurs folioles deviennent coriace et piquant à l'extrémité .
- **Les fleurs** : Sont jaunes en grappe axillaires dense .
- **Les gousses** : Couvertent d'un duvet soyeux . Elles sont très résistantes à la sécheresse .
- **Habitat** : En pieds isolés ou en petites colonies, dans les terrains sablonneux .
- **Répartition** : Assez commun dans tout le sahara . Endémique .
- **Période de végétation** : Floraison en mars- avril.
- **Utilisation** :
- **Intérêt pastoral** : C'est un excellent pâturage pour les dromadaires (**CHEHMA, 2006**) .



Photos1 : A- pied d'*Astragalus* **B-** Feuilles **C-**Graines **D-**Gousses **E-**Fleurs

- **Le genre *Astragalus* :**

- **Genre et espèce** : *Astragalus Gombo*
- **Famille** : Leguminosae.

- **Nom vernaculaire** : Djelban el hamir , Foul el hamir, Gelga (QUEZE et SANTA, 1962) , Foul el ible et el Faila ((CHEHMA, 2006) .
- **L'intérêt médicinal de l'Astragale**

- **Les extraits d'astragale (*Astragalus membranaceus*)**

L'astragale est utilisé comme fortifiant et pour renforcer la fonction immunitaire par la médecine traditionnelle chinoise depuis des centaines d'années. L'astragale contient entre autres une série de glycosides triterpène cycloartane dénommés astragalosides I à VIII.

- Dans les années 1980, l'astragale est devenu extrêmement populaire aux États- Unis à travers les médias comme stimulant du système immunitaire.

Aujourd'hui, la plupart des recherches pharmacologiques portant sur l'astragale sont concentrées sur ses polysaccharides immunostimulants et sur d'autres de ses ingrédients actifs utiles pour traiter des maladies liées à des déficiences immunitaires(**NUTRA NEWS, 2011**) .

- Dans l'étude de la composition chimique et l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Astragalus gombo* collectée à partir de deux sites de la Tunisie (Sidi Bouzid et Sbitla) ont été trouver que les huiles essentiels d'*Astragalus gombo* renferment quelques composés actifs comme le γ -terpinène possédant une activité antioxydante et l' α -pinène, le camphène et le terpinène-4-ol possédant des activités antibactérienne et anti-inflammatoire (**TEYEB et al., 2012**) .
- A el Oued Souf , cette plante est utilisé comme tisane .

III. Le microsymbiont : (Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) :

Le terme de *Rhizobium* a été utilisé en premier pour désigner ces bactéries formant des nodules sur les légumineuses. Du grec, «*Rhizo*» =racine et «*bium*» =vivant. Dénommé ainsi par Franck car ce microorganisme vit dans les racines (**ZAKHIA, 2004**). Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses ou BNL sont des bactéries aérobies, Gram négatives, mobiles, sans spores dont la vitesse de croissance sur le milieu YMA est variable.

Ainsi, **JORDAN (1984)** attribue le nom de *Bradyrhizobium* aux souches qui sont à croissance lente. Du point de vue phylogénétique, elles font partie de la sous-classe alpha (**STACKEBRANDT et al., 1988**) ou Bêta des protéobactéries (**MOULIN et al., 2001 ; CHEN et al., 2001**).

III.1 Classification actuelle des *Rhizobia* :

Les différentes espèces reconnues des *Rhizobia* sont décrites dans le (**Tableau 1**) ci-dessous.

Tableau 1. Classification courante de rhizobia (**BERRADA et FIKRI-BENBRAHIM, 2014**).

Genre et espèces	Source d'isolement
<i>Class: Alphaproteobacteria</i> <i>Order: Rhizobiales</i>	

Family: <i>Rhizobiaceae</i>	
Genus: <i>Rhizobium</i>	
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>symbiovar viciae</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>
<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>
<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. tropici</i>	
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
<i>symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>

<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>
<i>R. radiobacter</i>	*
<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*
Genus: Ensifer	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>E. terangae</i>	<i>Different host plants</i>
<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>)	<i>Glycine max</i>
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>

<i>E.mexicanus</i> <i>E.numidicus</i> Genus: Shinella <i>S. kummerowiae</i>	<i>Acacia angustissima</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Kummerowia stipulacea</i>
Family: Phyllobacteriaceae Genus: Mesorhizobium <i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i> <i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. amorphae</i> <i>M. chacoense</i> <i>M. septentrionale</i> <i>M. temperatum</i> <i>M. thioglycolicum</i> <i>M. albiziae</i> <i>M. caraganae</i> <i>M. gobiense</i> <i>M. tarimense</i> <i>M. australicum</i> <i>M. opportunistum</i> <i>M. metallidurans</i> <i>M. alhagi</i> <i>M. camelthorni</i> <i>M. abyssinicae</i> <i>M. muleiense</i> <i>M. hawassense</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i> <i>Astragalus sinicus</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis,</i> <i>Amorpha fruticosa</i> <i>Prosopis alba</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Astragalus adsurgens</i> * <i>Albizia kalkora</i> <i>Caragana spp.</i> <i>Wild legumes</i> <i>Wild legumes</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Alhagi</i> <i>Alhagi sparsifolia.</i> <i>Different agroforestry legume trees</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Different agroforestry legume trees</i>

<i>M. qingshengii</i> <i>M. robiniae</i> <i>M. shonense</i> <i>M. shangrilense</i> <i>M. silamurunense</i> <i>M. tamadayense</i> Genus: <i>Phyllobacterium</i> <i>P. trifolii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> <i>Robinia pseudoacacia</i> <i>Different agroforestry legume trees</i> <i>Caragana species</i> <i>Astragalus species</i> <i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i> <i>Trifolium pratense</i>
Family: <i>Methylobacteriaceae</i> Genus: <i>Methylobacterium</i> <i>M. nodulans</i> Genus: <i>Microvirga</i> <i>M. lupini</i> <i>M. lotononidis</i> <i>M. zambiensis</i> Family: <i>Brucellaceae</i> Genus: <i>Ochrobactrum</i> <i>Ochrobactrum cytisi</i> <i>Ochrobactrum lupini</i>	 <i>Crotalaria spp.</i> <i>Lupinus sp.</i> <i>Different legume host</i> <i>Different legume host</i> <i>Cytisus</i> <i>Lupinus albus</i>
Family: <i>Hyphomicrobiaceae</i> Genus: <i>Azorhizobium</i> <i>A. caulinodans</i> <i>A. dobereinereae</i> <i>A. oxalatophilum</i> Genus: <i>Devosia</i> <i>Devosia neptuniae</i>	 <i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgata</i> <i>Neptunia natans</i>
Family: <i>Bradyrhizobiaceae</i> Genus: <i>Bradyrhizobium</i>	

<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> <i>B. iriomotense</i> <i>B. jicamae</i> <i>B. lablabi</i> <i>B. huanghuaihaiense</i> <i>B. cytisi</i> <i>B. daqingense</i> <i>B. denitrificans</i> <i>B. oligotrophicum</i> <i>B. pachyrhizi</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Lespedeza</i> <i>Betae vulgaris</i> <i>Genistaeae et Loteae</i> <i>Entada koshunensis</i> <i>Pachyrhizus erosus</i> <i>Lablab purpureus</i> <i>Glycine max</i> <i>Cytisus villosus</i> <i>Glycine max</i> <i>Aeschynomene</i> <i>Pachyrhizus erosus</i>
Class: <i>Beta Proeobacteria</i> Order: <i>Burkholderiales</i> Family: <i>Burkholderiaceae</i> Genus: <i>Burkholderia</i> <i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. nodosa</i> <i>B. sabiae</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. rhizoxinica</i> <i>B. diazotrophica</i> <i>B. endofungorum</i> <i>B. heleia</i>	<i>Vertisol microaggregates</i> <i>Alysicarpus glumaceus</i> <i>Aspalatus carnosa</i> <i>Machaerium lunatum</i> <i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i> <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Eleocharis dulcis</i>

<i>B. symbiotica</i> Genus: <i>Cupriavidus</i> <i>C. taiwanensis</i> Class: <i>Gamma-Proteobacteria</i> Order: <i>Pseudomonadales</i> Family: <i>Pseudomonaceae</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Mimosa spp.</i> <i>Aspalatus carnosa</i> <i>Mimosa sp.</i> <i>Robinia pseudoacacia</i>
--	--

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Isolement des bactéries à partir des nodules d'*Astragalus gombo*

Les nodules ont été obtenus associé avec les racines d'*Astragalus gombo* trouvés dans plusieurs régions de Sud-Est Algérien .Nous avons choisi un échantillon collecté par l'étudiant **Achour Hamza** en **Mars 2013** à partir de la région El Choucha commune El Hadjebe wilaya de Biskra , Algérie (latitude 35°02'01,45"N et longitude 5°36'08,63"E) (**Figure 5**).



Figure 5 :Localisation géographique des zones de prélèvement (CRSTRA, 2014).

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 fixation active de l' azote .

I-2- Conservation des nodules

les nodules ont été conservés de l'année précédente selon la méthodes de dessiccation qui est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrit par (VINCENT 1970 et SOMASEGARAN ET HOBEN 1994). Qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par

du CaCl_2 (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules (**Figure 6**).

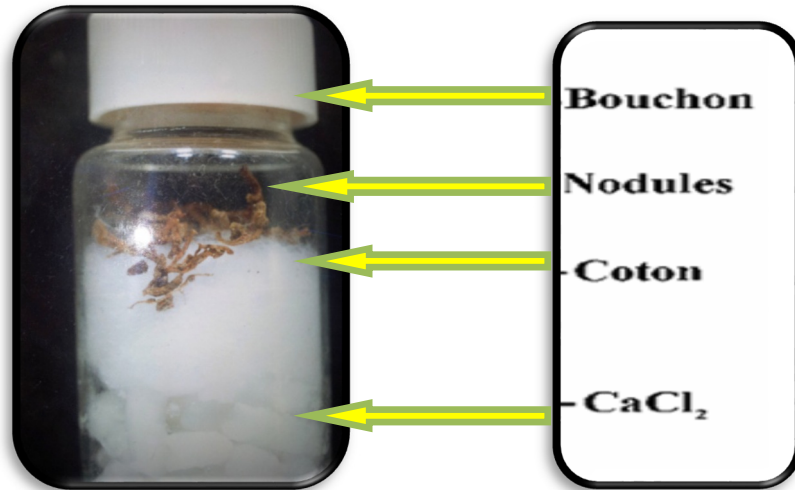


Figure 6: Conservation des nodules sous CaCl_2 (VINCENT, 1970).

I-3- Isolement des souches à partir des nodules

La technique d'isolement des bactéries est celle décrit par VINCENT(1970) et SOMASEGARAN ET HOBEN (1985, 1994) d'après (**Figure 7**) .

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles qui sont conservée 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.

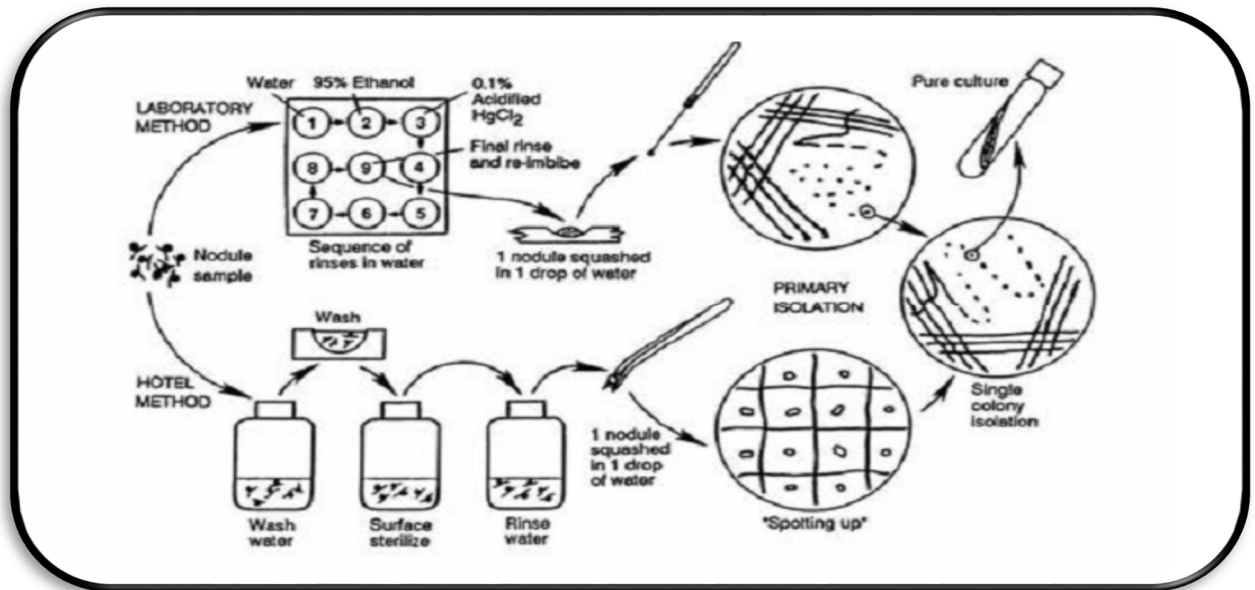


Figure 7: Procédures d'isolement comme employées par (SOMASEGARAN ET HOBEN , 1985).

I-3-1- Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergée dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans l'eau de javel (ou hypochlorite de sodium et d'eau) ou le Chlorure de mercure acidifié 0.1%(1g HgCl₂ +5ml Hcl +1L d'eau distillée) pendant 3mn. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10^{ème} rinçage laisser pendant 30 mn ou 1h .

I-3-2- Ecrasement des nodules

Dans une boîte de Pétri stérile on dépose 2 à 3 gouttes d'eau distillée 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 (**Figure 8**) .

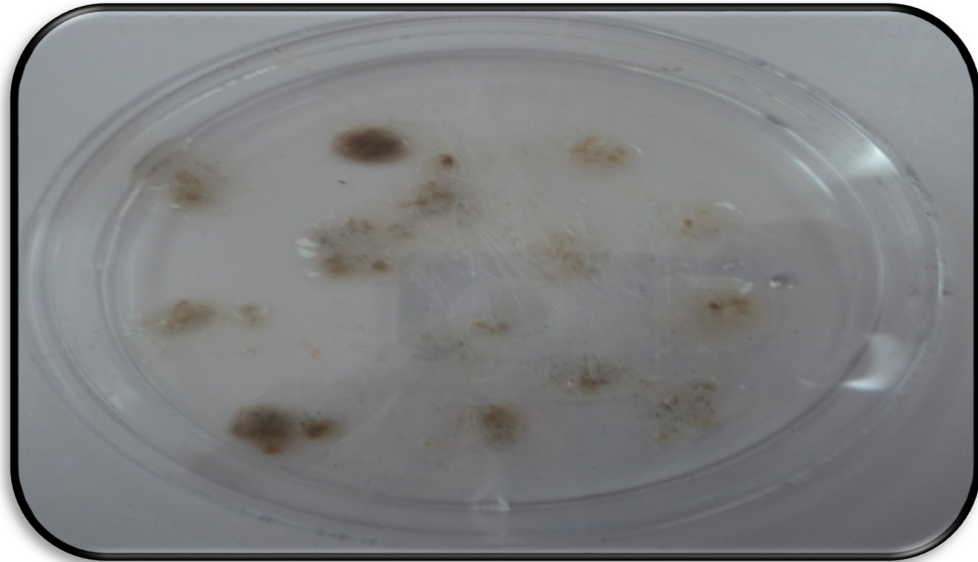


Figure 8: Les nodules sont écrasés dans une boîte de pétri .

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 puis étaler selon la technique des quatre cadrans (**VINCENT, 1970**) (**Figure 9**) 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 contrôlés sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen.

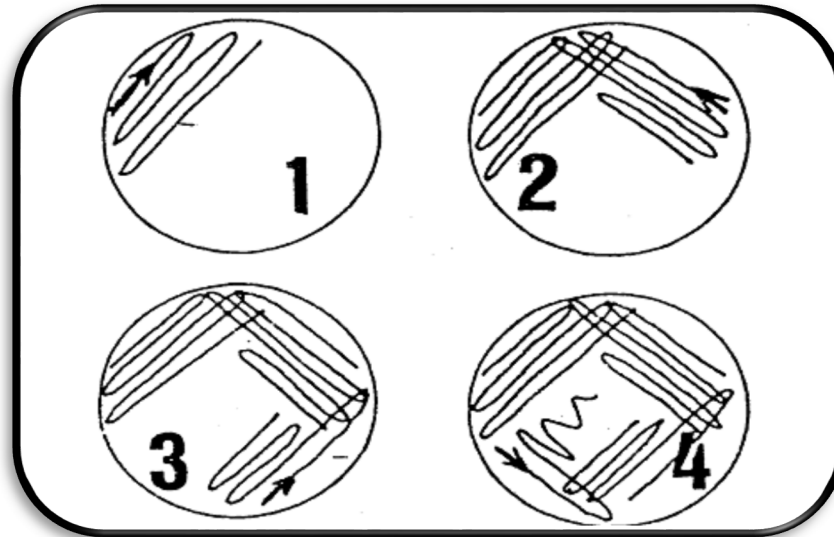


Figure 9: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent,1970).

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 (**Annexe 1**).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques et les solutions qui sont dont la composition est la suivante :

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

YMA+RC (Yeast Mannitol Agar+ Rouge Congo)

YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar+ Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

- Solution rouge Congo.
- Solution stock Bromothymol (BTB) .
- Solution stock de pourpre de Bromocrésol (BcP).

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20mn et le pH des milieux est ajusté à 6,8(**Annexe 3**).

II-2- Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (YMA+RC, YMA+BTB et GPA+BcP) (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 TY puis les placer dans un bain-marie à 28°C et ce dernier est remplacé par le Vortexe. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC pendant 24h à 48h. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologiques sont enfin réalisés.

II-3- Examens microscopiques (Coloration de Gram)

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

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram est réalisée, qui va permettre de visualiser les bactéries au microscope optique.

II-4- Examen de la mobilité :

Par une anse de platine contenant une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité(Annexe 1). Incuber pendant 24h et observer.

II-5- 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 incubateur à une température de 28°C. La méthode choisie est celle de la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 28°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C (Figure 10).

Cette méthode permet une conservation de 6 à 12mois (VINCENT, 1970).



Figure 10 : Conservation des souches sur milieux inclinés.

Après incubation les souches sont stockées au réfrigérateur en vu de leur Caractérisation .

III- Caractérisation phénotypique des isolats

III-1- Test nutritionnel

III-1-1- Utilisation des sucres comme seul source de carbone

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

On ensemence les différents milieux (**Photo 02**) et on incube à 28°C dans un incubateur pendant 24h avec Agitation dans un Vortexe, puis mesurer la DO à 600nm(**Annexe 3**) .

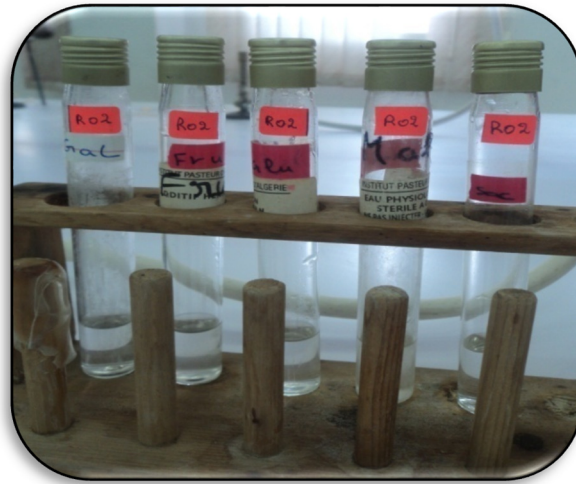


Photo 02 :Les différents milieux .

III-2- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)

III-2-1- Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales de croissance , les isolats sont mises en culture sur le bouillon TY liquide et incubé à 24h puis sur milieu YMA solide ,incuber à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C.

III-2-2- Effet de pH

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (5, 6, 6.8,7.5, 8).

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

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

III-3-1- Réduction des nitrates

Les souches sont cultivées sur le bouillon Tryptone-Yeast (TY) contenant 0.1% de nitrate de potasium (KNO_3) (p/v), et incubées pendant 4 jours à 28°C ; après l' incubation 3à 4 goutte **des réactifs I et II** sont ajoutés (**Annexe 4**).

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

III-3-2- Activité pectinolytique

Les souches sont cultivées à 28°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 Ruthénium 0.05% pendant 30 minutes. Un halo clair autour des colonies indique la présence d'une Polygalacturonase .

III-3-3- 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 laisser 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 .

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I-Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats

Sur le nombre total des nodules récoltés (27 nodules) à partir des racines d'*Astragalus gombo*, nous avons tenu compte de 05 isolats dont les colonies absorbent très peu le rouge Congo (**Tableau 02**).

Les autres colonies contaminantes sont fortement colorées et acidifient lentement le milieu

Glucose-Peptide-Agar en présence du Pourpre de Bromocrésol .

Tableau 02: les souches et les souches de références utilisées dans cette étude.

Code de la souche	Nom de la souche	Plante hôte	Origine géographique	Source
R ₂	Isolat	<i>Astragalus Gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
R ₆	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
R ₈	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
S ₄	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
S ₅	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude

A ₀₆	Rhizobium sulae sp.nov.RHA6	H.Coronarium	Constantine Algérie	A.Benguedouar - Algérie
HCNT1	R.sulae HCNT1	H.Coronarium	Volterra ,Italie	S.Casella- Pise

I-1 Croissance des isolats sur YMA

Après l'écrasement de toutes les nodules récoltés et l'ensemencement, les 05 boîtes ayant donné des colonies ,après 72 heures ,sur le milieu YMA , elles ont une couleur blanche ou crème, forme convexe et un aspect lisse brillant avec une texture translucide (**Photo 03**). Ce résultat est en accord avec le résultat de **TORCHE (2006)** .

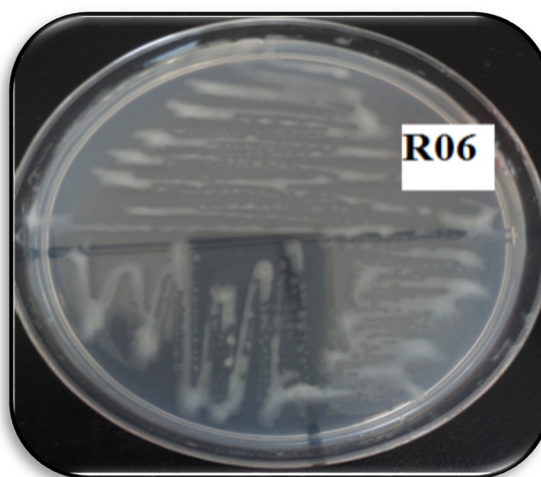


Photo 03 : Aspect des colonies sur YMA (isolat R06).

I-2- Croissance des isolats sur YMA+ Rouge Congo

Les souches isolées à partir des nodules d'*Astragalus gombo* apparaissent avec une couleur rosâtre et absorbent peu le rouge Congo sur milieu YMA (**photo 04**). Ceci est le caractère général du genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (**VINCENT, 1970**). Ce résultat est concordance avec le résultat qui est déclarée par **KNEEN et La RUE (1983)** .

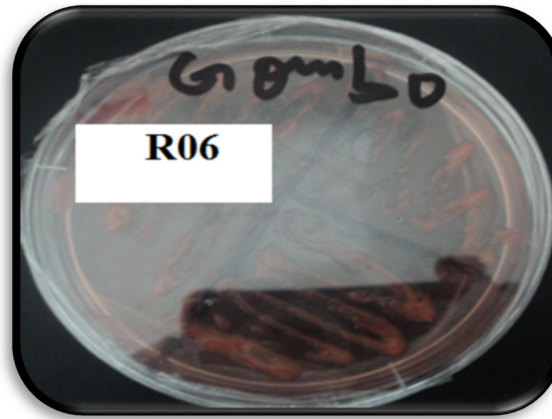


Photo 04 : Aspect des colonies sur YMA + Rouge Congo (isolat R06).

I-3-Examens de la mobilité

Après avoir réaliser l'ensemencement des isolats sur le milieu Mannitol mobilité incubé à 28°C pendant 48h, on observe un changement de couleur du rougeâtre vers la couleur jaunâtre dans l'isolat R06 et diffusion dans la milieu , par contre les isolats R02 , S04,S05 ont un changement faible de la couleur rougeâtre vers la couleur jaunâtre. L'isolat R08 ne modifie pas le couleur rouge . Donc l'isolat R08 non mobile et n'acidifier pas le milieu donc ne fermente pas le mannitol ,les isolats précédantes peu acidifient le milieu donc fermentent faiblement le mannitol. Le seule isolat R06 est mobiles avec une acidification du milieu indiquant que le isolat fermente le mannitol (**Photo 05**). Ces résultats sont conformés à ceux de **CHABBI (2010)**.

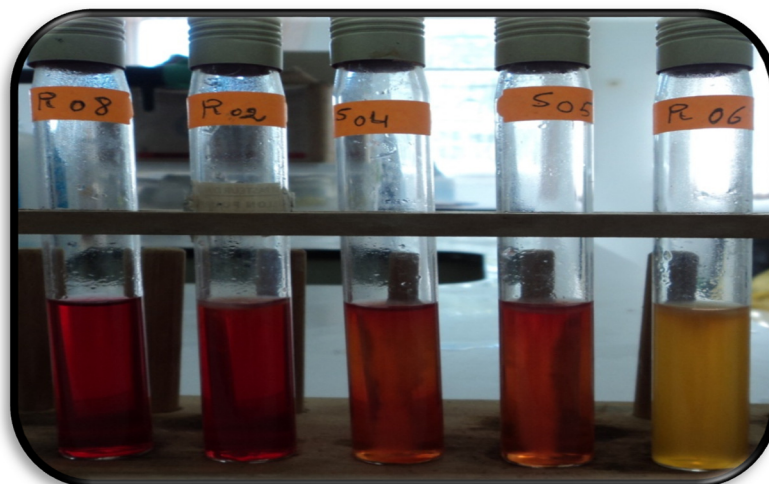


Photo 05 :Examen de la mobilité .

I-4-Examen microscopique par coloration de Gram

Suite à la coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé des bâtonnets roses (**Photo 06**). Cette bactérie se classe donc parmi les bactéries Gram négatif (-), cela prouve que les isolats isolées appartient au genre *Rhizobium*. Ces résultats sont en concordance avec l'étude de **SOMASEGARAN et HOBEN (1994)**.

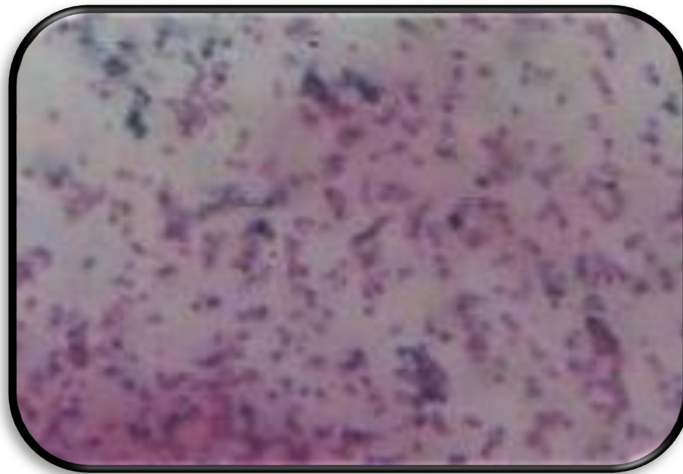


Photo 06 : Coloration de Gram des isolats.

I-5-La vitesse de croissance

En prenant comme critère de croissance, nos isolats donnent des colonies visibles après 3 jours d'incubation à 28°C, ce qui indique que les isolats présentent une croissance rapide. Cette constatation est confirmée par les deux tests suivants :

- 1- Nos isolats modifient le pH sur le milieu Glucose Peptone Agar (GPA) additionné de Pourpre de Bromocrésol (BCP) après 24 h (**VINCENT ,1970 et 1982 ; JORDAN, 1984 ; CHEN et al., 1991**) (**photo 07**) .
- 2- D'autre part nos souches appartiennent à un genre de bactérie à croissance rapide puisque le milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB) est acidifié après 24h d'incubation (virage au jaune de l'indicateur de pH visible dans la **Photo 08** .

Ainsi le BTB est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique, une réaction acide se traduit par le changement de la coloration BTB vert vers le jaune (**EL HILALI, 2006**), ainsi (**BECK et al., 1993**) considèrent les *Rhizobium* à croissance rapide changent la couleur bleue vers le jaune, par contre les *Rhizobium* à croissance lente

alcalinisent le milieu qui se traduit par un renforcement de la coloration bleue (**JORDAN, 1984**).

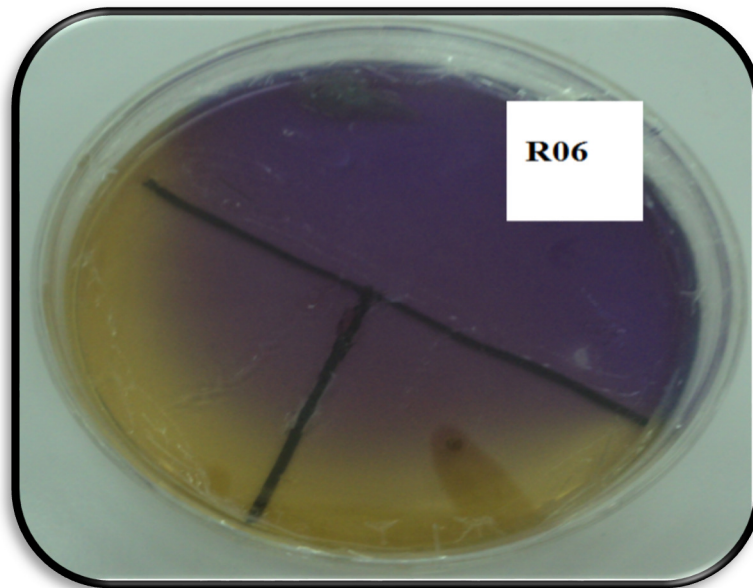


Photo 07: Aspect des colonies sur GPA+BcP (R06).

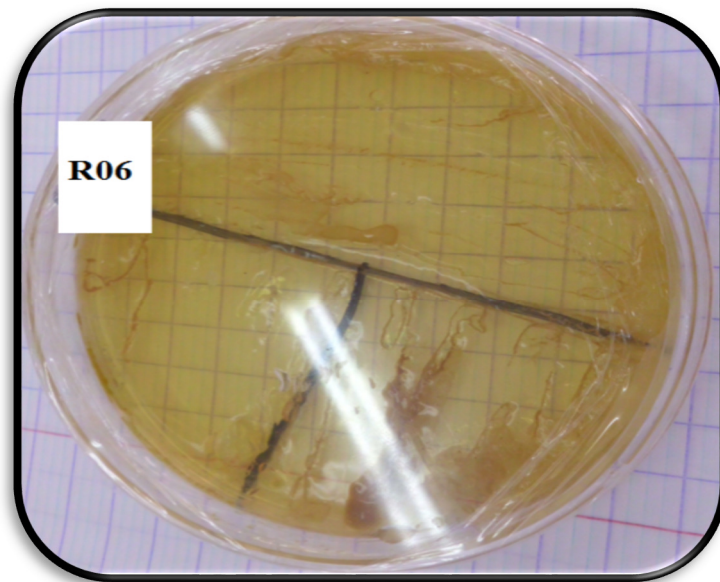


Photo 08 : Aspect des colonies sur YMA+BTB(R06) .

II- Test nutritionnel

II-1- Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Après incubation, on remarque que tous les isolats, assimilent bien les sucres simples

(glucose , galactose et fructose), on enregistre une assimilation faible des sucres composés (saccharose et maltose) avec les isolats.

Toutefois, les *Rhizobium* diffèrent dans leur aptitude à assimiler les différentes sources de carbone . Les mesures de la densité optique montrent que les deux souches **R₀₆** et **S₀₄** assimilent le glucose préférentiellement comme les deux souches de référence **A6** et **HCNT1**. D'autre part nous avons signalé que les isolats **S₀₅** , **R₀₂** , **R₀₈** assimilent bien le galactose ,le glucose, le saccharose, même resultat et pour les souches de référence par ce qu'elles utilisent toutes les sucres avec une préférence au fructose. Le glucose est le sucre le mieux assimilé en particulier par **R₀₂** , **R₀₆**, **R₀₈** . Tandis que le saccharose est assimilé de préférence par **S₀₄** , **S₀₅** . On remarque que le maltose est le sucre le moins utilisé par tous les isolats (**Figure 11**).

Ce résultat se concorde avec les travaux des auteurs suivant (**ALLEN et ALLEN, 1950 ; STOWERS, 1985**) prouvant que 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. 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.

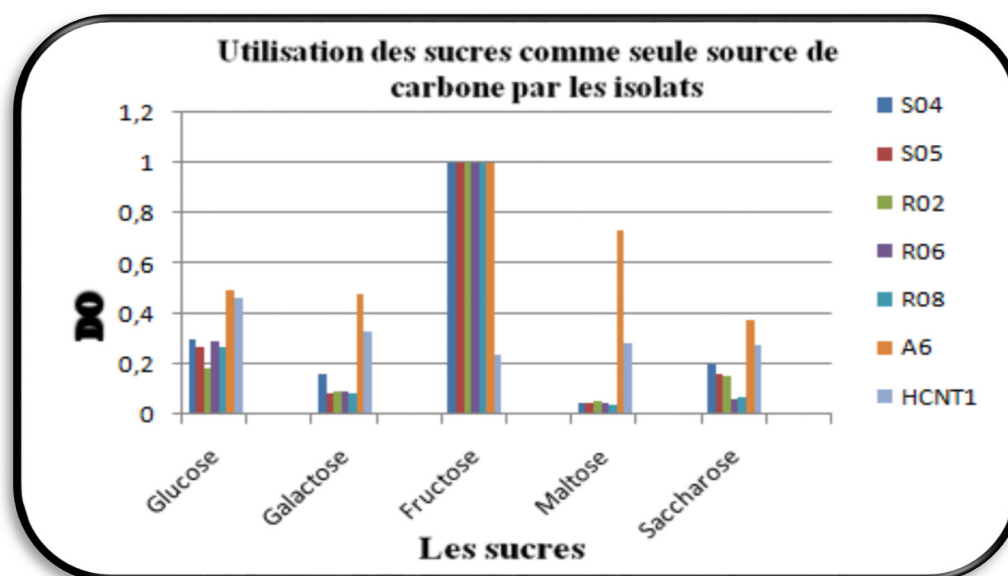


Figure 11: Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats .

III-Tests physiologiques

III-1-Effet de la température

Seulement les deux souche R_{02} et R_{06} (**Photo 09**), (**Photo10**), (**Photo11**) et (**Photo12**) sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 28°C avec une croissance optimal dans l'intervalle de 20°C à 28°C les deux isolats R_{02} , R_{06} sont similaire avec les deux souches de référence A6 et HCNT1 de croître à une température optimal le tableau (**Annexe 5**) . De la température , 4°C à 37°C la croissance n'est pas observée chez des souches S_5 et R_8 . On remarque également une croissance faible chez le isolat R_2 à 4°C l'exception est remarqué avec l'isolat S_{04} qui vivre seulement dans la température 37°C . Ces résultats sont concordance avec les résultats de **GRAHAM (1992)** qui montre que les *Rhizobia* sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C .

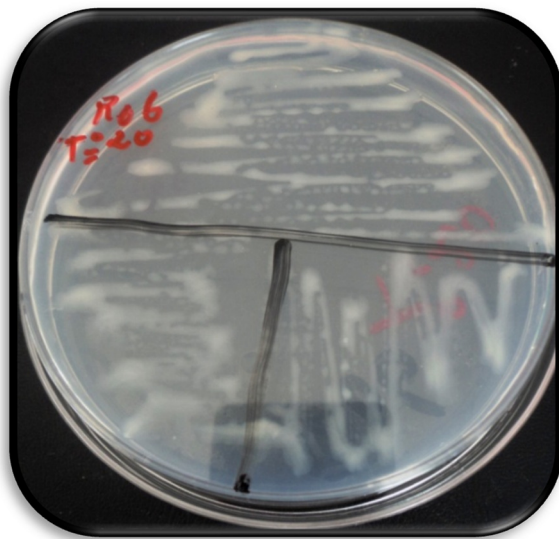


Photo 09: Effet de la température 20°C .

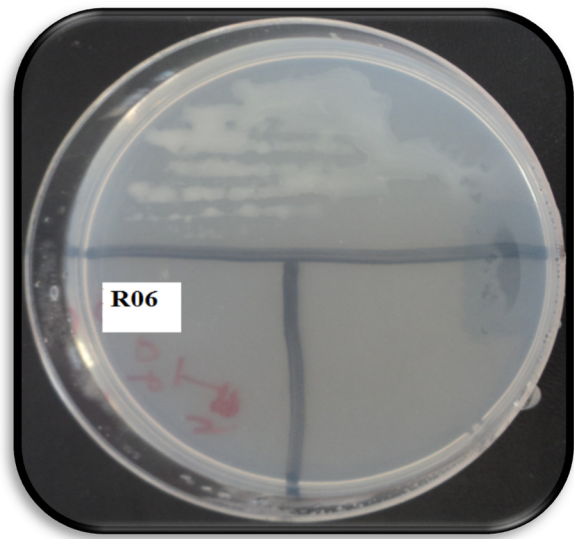


Photo 11 : Effet de la température 4°C .

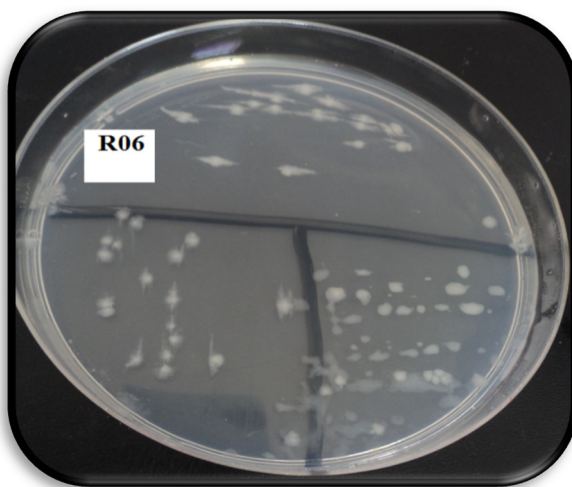


Photo 10: Effet de la température 28°C .

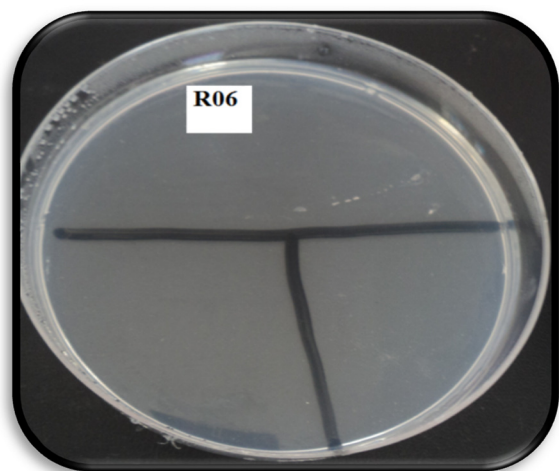


Photo12 : Effet de la température 37°C .

III-2-Effet de pH

Les résultats de l'effet des pH acides et alcalins de l'ensemble des souches de la collection sont présentés dans le tableau (**Annexe 5**). D'après l'histogramme, on remarque que la totalité des isolats poussent dans l'intervalle de pH=5 et pH=8. Une croissance importante est enregistrée avec le pH=6,8, c'est le pH optimum de la croissance du *Rhizobium* (**Figure 12**) (**SOMASEGARAN et HOBEN, 1994**). Les pH alcalins sont les plus tolérés que les pH acides. Toutes les souches ont pu tolérer la grande valeur de pH testée qui est de 8. La tolérance à l'acidité s'est révélée par contre très variable avec des pH comprise entre 5 et 6. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **JORDAN (1984)** et **BECK et al., (1993)** et **El Hillali (2006)** qui ont rapporté une tolérance allant du pH=5 au pH=9,5 pour des souches isolées de plusieurs espèces. Ce test est répété une deuxième fois afin de corriger les erreurs de la lecture des échantillons de pH= 8 par le spectrophotométrie et les tubes à vis sont manqués pour faire la dilution.

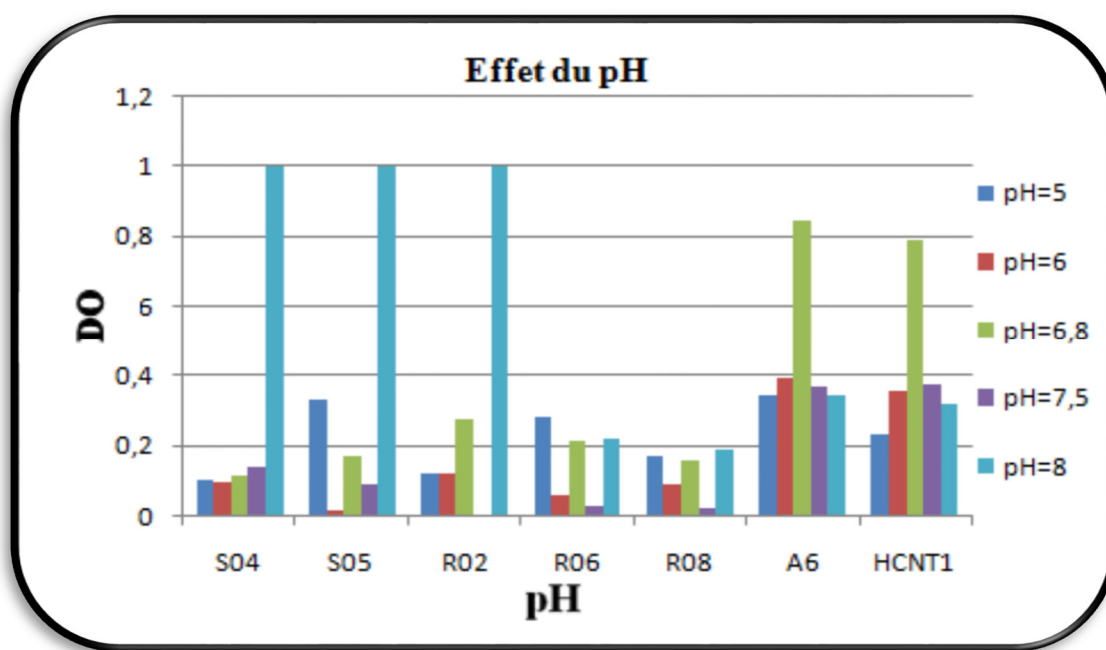


Figure 12: Effet du pH.

IV- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)

IV-1- Réduction des nitrates

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur plantes hôtes. Le nitrate est réduit en nitrite par le nitrate réductase qui catalyse la réaction suivante :



Après l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs nitrate réductase **I** et **II** (**Annexe 4**) les isolats **S₀₄**, **S₀₅**, **R₀₂**, **R₀₆**, **R₀₈** ne donnent pas le couleur rouge ou rose ,indiquant la non réduction des nitrates (**Tableau 03** et **photo 13**) .On doit ajouter la poudre de zinc, pour confirmer la possession ou non de l'enzyme mais malheureusement ,cette poudre est déficiente au niveau de laboratoire .Donc nos résultats n'accord pas avec les résultats de **GHARZOULI (2006)** qui va rapporter que les souches donnent des colorants rougeâtres ,elles possèdent donc une enzyme nitrate réductase qui catalyse la réduction de nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-). Il est bien connu que le nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses (**LUCIŃSKI et al., 2002**). L'aptitude à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière (**EL HILLALI, 2006**).

Tableau 03 : Réduction des nitrates.

	S₀₄	S₀₅	R₀₂	R₀₆	R₀₈
Réduction de nitrates	-	-	-	-	-

NB : (-) : négative , ne peut pas confirmer la réaction négative des souches parce que le poudre de Zinc pure est manque.

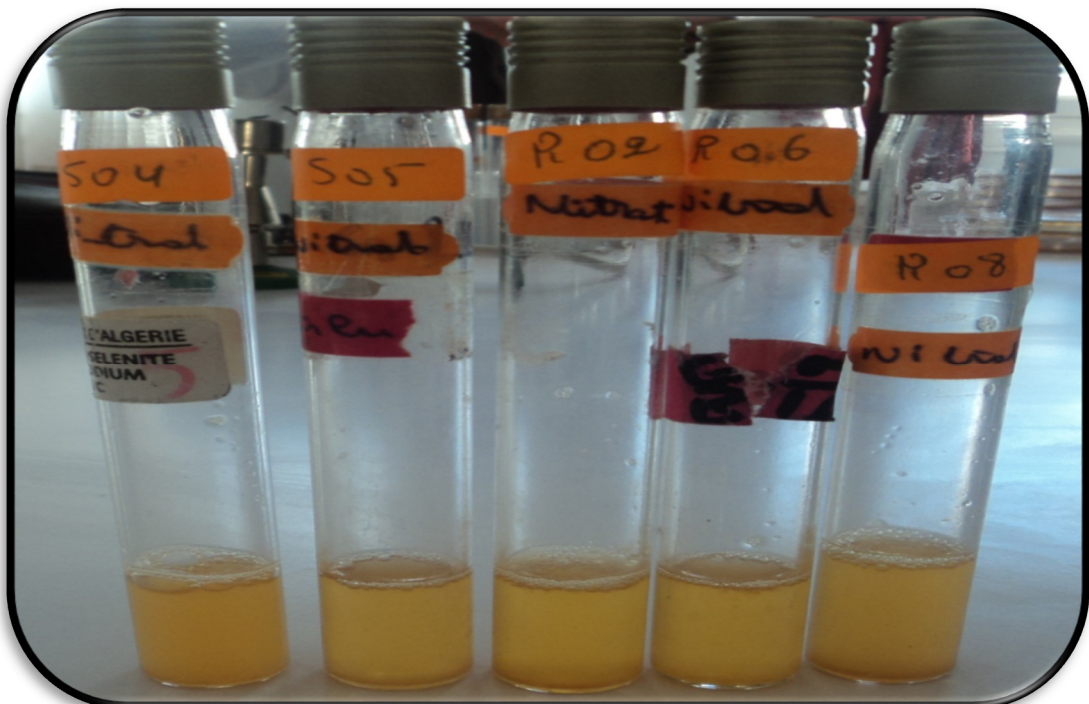
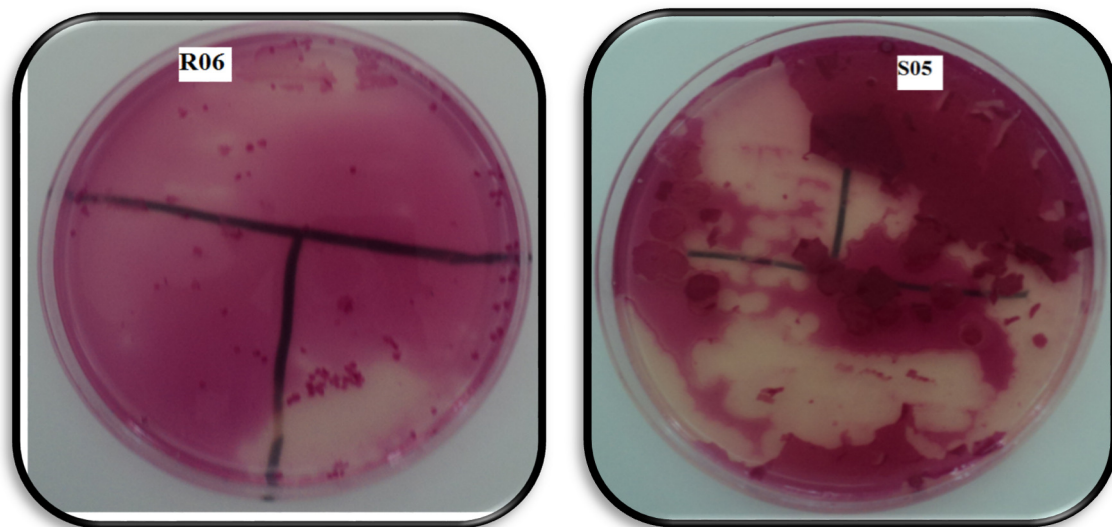


Photo 13 : Réduction des nitrates (isolats **S04 S05, R02 , R06, R08**).**IV-2- Activité pectinolytique**

Après addition du rouge de Ruthénium et le rinçage avec de l'eau, un halo clair (**Photo 14**) est observé autour des colonies indiquant une réaction positive est représentée dans le (**Tableau 04**). Tous les isolats ont une activité polygalacturonasique. Deux enzymes : endoglucanase et polygalacturonase, dégradant les ponts glucidiques de la paroi cellulaire secrète par l'espèce du *Rhizobium sullae* . Nos résultats sont en accord avec les travaux sur le *Rhizobium sullae* de **STRUFFI et al ., (1998)**.

Tableau 04 : Activité pectinolytique .

	S04	S05	R02	R06	R08
Activité pectinolytique	+	+	+	+	+

**Photos 14** : Activité pectinolytique.**IV-3-Activité cellulolytique**

Après l'incubation des boîtes qui sont rincées avec l'eau courante puis inondées avec la solution de NaCl pendant 30 mn. On remarque chez les isolats l'absence d'un halo jaune orangé autour des colonies (**Photo 15**) indique l'absence d'une endoglucanase (cellulase) donc

l'activité cellulolytique est négative. D'autre part nous avons signalé que les isolats S₀₄, S₀₅, R₀₂, R₀₆, R₀₈ sont similaires aux souches de références A6 et HCNT1 parce qu'elles ne donnent aucune activité cellulolytique (**Tableau 05**). Nos résultats obtenus sont en accord avec **BENHIZIA, 2006**) qui rapporte que les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* laissent apparaître une activité cellulolytique négative.

Tableau 5 : Activité cellulolytique .

	S ₀₄	S ₀₅	R ₀₂	R ₀₆	R ₀₈	A6	HCNT1
Activité cellulolytique	-	-	-	-	-	-	-

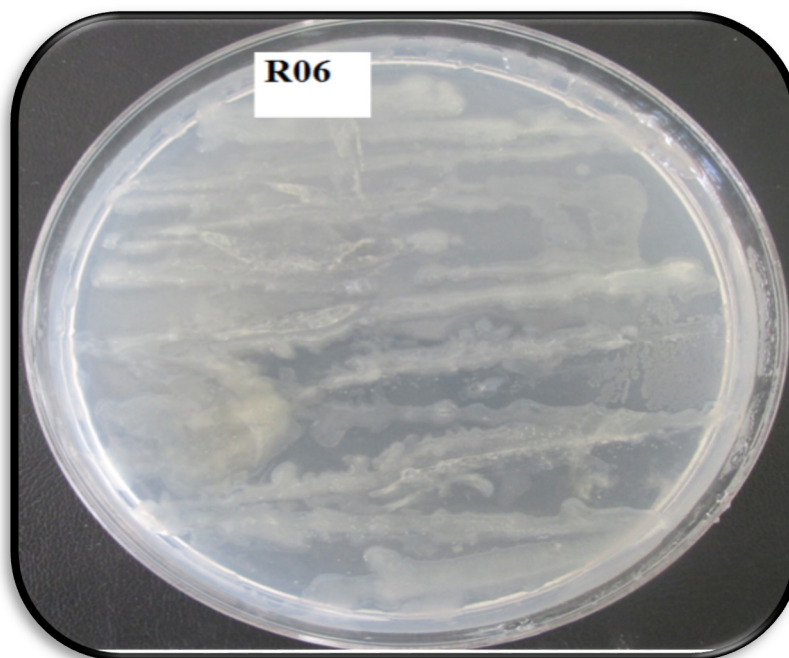


Photo 15 : Activité cellulolytique .

CONCLUSION GENERALE

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Isolement des bactéries à partir des nodules d'*Astragalus gombo*

Les nodules ont été obtenus associé avec les racines d'*Astragalus gombo* trouvés dans plusieurs régions de Sud-Est Algérien .Nous avons choisi un échantillon collecté par l'étudiant **Achour Hamza** en **Mars 2013** à partir de la région El Choucha commune El Hadjebe wilaya de Biskra , Algérie (latitude 35°02'01,45"N et longitude 5°36'08,63"E) (**Figure 5**).



Figure 5 :Localisation géographique des zones de prélèvement (CRSTRA, 2014).

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 fixation active de l' azote .

I-2- Conservation des nodules

les nodules ont été conservés de l'année précédente selon la méthodes de dessiccation qui est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrit par (VINCENT 1970 et SOMASEGARAN ET HOBEN 1994). Qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par

du CaCl_2 (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules (**Figure 6**).

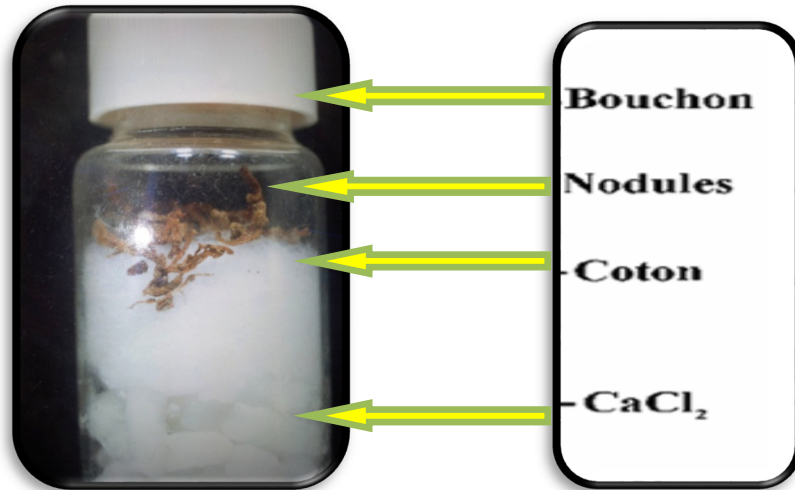


Figure 6: Conservation des nodules sous CaCl_2 (VINCENT, 1970).

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) d'après (**Figure 7**) .

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.

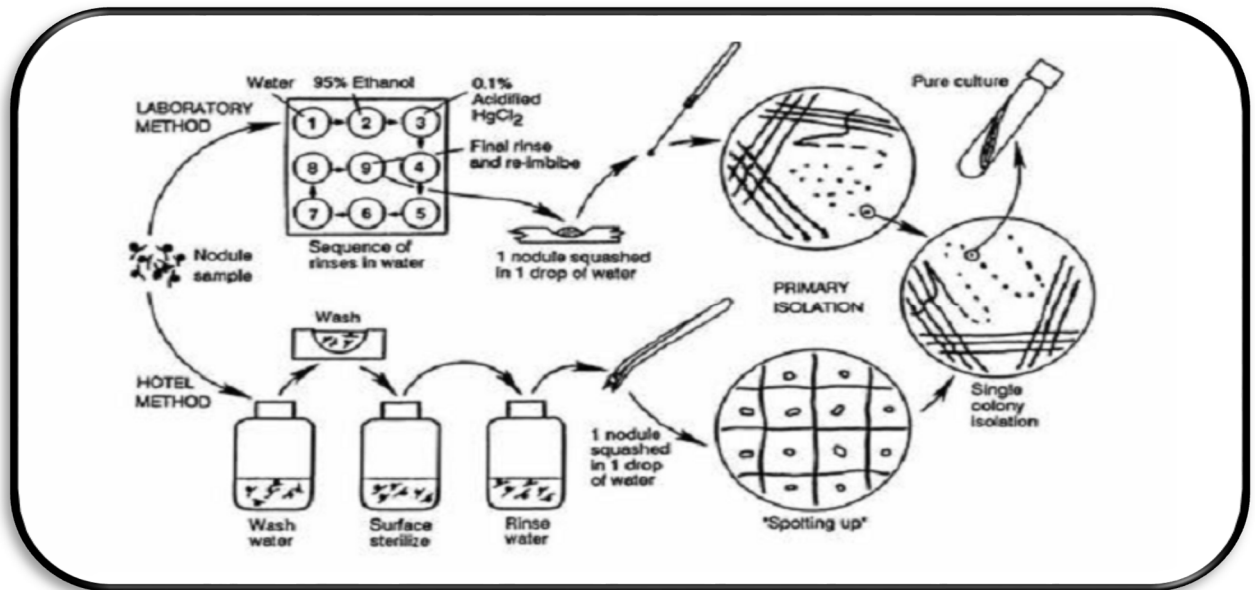


Figure 7: Procédures d'isolement comme employées par (SOMASEGARAN ET HOBEN , 1985).

I-3-1- Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergée dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans l'eau de javel (ou hypochlorite de sodium et d'eau) ou le Chlorure de mercure acidifié 0.1%(1g HgCl₂ +5ml Hcl +1L d'eau distillée) pendant 3mn. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10^{ème} rinçage laisser pendant 30 mn ou 1h .

I-3-2- Ecrasement des nodules

Dans une boîte de Pétri stérile on dépose 2 à 3 gouttes d'eau distillée 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 (**Figure 8**) .

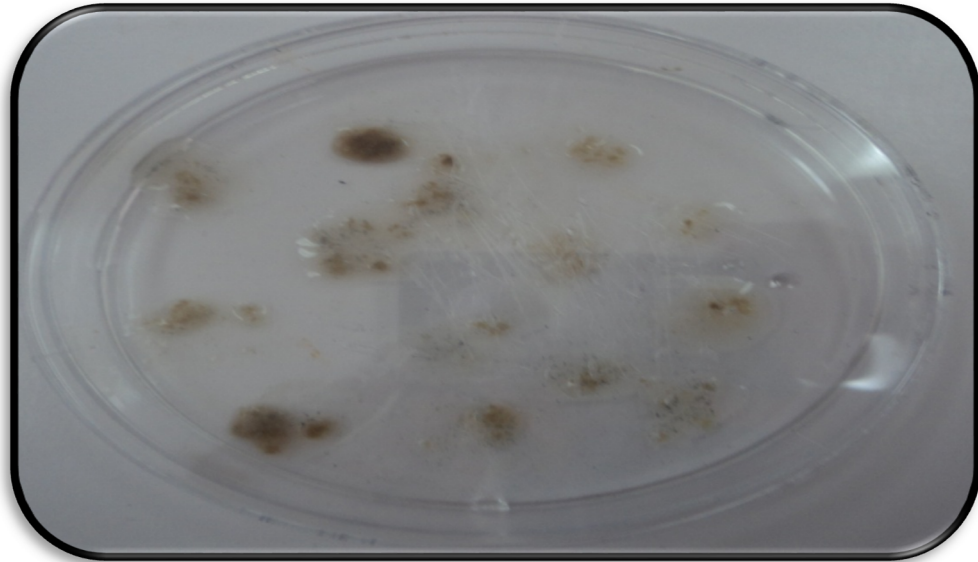


Figure 8: Les nodules sont écrasés dans une boîte de pétri .

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 puis étaler selon la technique des quatre cadrans (**VINCENT, 1970**) (**Figure 9**) 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 contrôlés sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen.

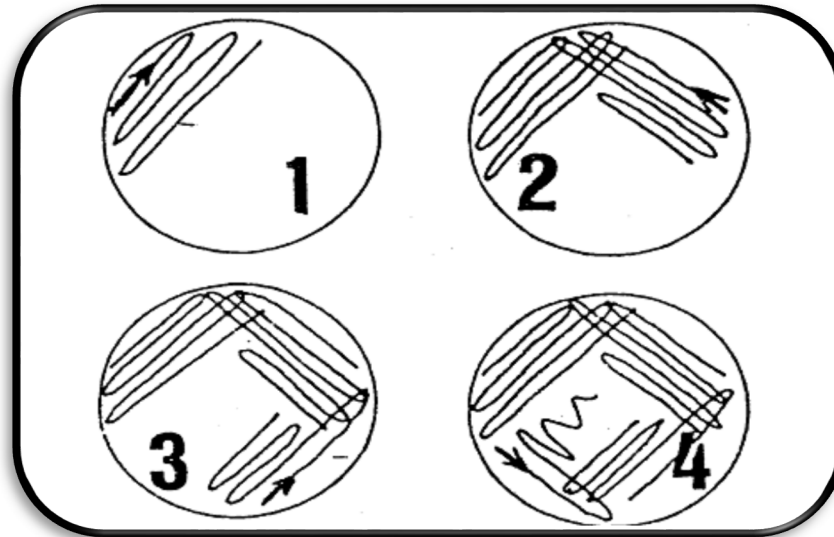


Figure 9: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent,1970).

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 (**Annexe 1**).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques et les solutions qui sont dont la composition est la suivante :

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

YMA+RC (Yeast Mannitol Agar+ Rouge Congo)

YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar+ Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

- Solution rouge Congo.
- Solution stock Bromothymol (BTB) .
- Solution stock de pourpre de Bromocrésol (BcP).

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20mn et le pH des milieux est ajusté à 6,8(**Annexe 3**).

II-2- Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (YMA+RC, YMA+BTB et GPA+BcP) (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 TY puis les placer dans un bain-marie à 28°C et ce dernier est remplacé par le Vortexe. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC pendant 24h à 48h. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologiques sont enfin réalisés.

II-3- Examens microscopiques (Coloration de Gram)

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

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram est réalisée, qui va permettre de visualiser les bactéries au microscope optique.

II-4- Examen de la mobilité :

Par une anse de platine contenant une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité(Annexe 1). Incuber pendant 24h et observer.

II-5- 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 incubateur à une température de 28°C. La méthode choisie est celle de la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 28°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C (Figure 10).

Cette méthode permet une conservation de 6 à 12mois (VINCENT, 1970).



Figure 10 : Conservation des souches sur milieux inclinés.

Après incubation les souches sont stockées au réfrigérateur en vu de leur Caractérisation .

III- Caractérisation phénotypique des isolats

III-1- Test nutritionnel

III-1-1- Utilisation des sucres comme seul source de carbone

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

On ensemence les différents milieux (**Photo 02**) et on incube à 28°C dans un incubateur pendant 24h avec Agitation dans un Vortexe, puis mesurer la DO à 600nm(**Annexe 3**) .

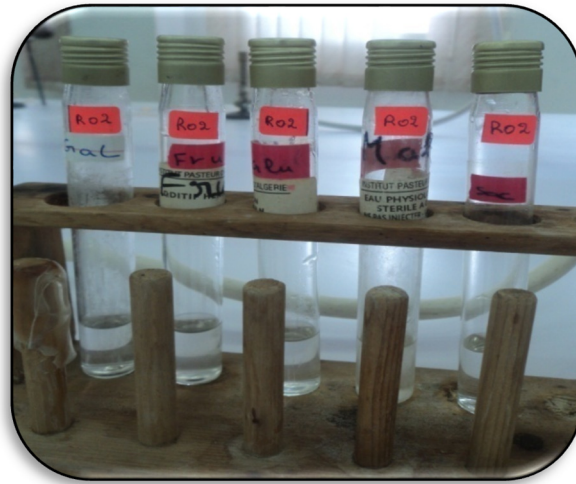


Photo 02 :Les différents milieux .

III-2- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)

III-2-1- Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales de croissance , les isolats sont mises en culture sur le bouillon TY liquide et incubé à 24h puis sur milieu YMA solide ,incuber à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C.

III-2-2- Effet de pH

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (5, 6, 6.8, 7.5, 8).

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

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

III-3-1- Réduction des nitrates

Les souches sont cultivées sur le bouillon Tryptone-Yeast (TY) contenant 0.1% de nitrate de potasium (KNO_3) (p/v), et incubées pendant 4 jours à 28°C ; après l' incubation 3à 4 goutte **des réactifs I et II** sont ajoutés (**Annexe 4**).

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

III-3-2- Activité pectinolytique

Les souches sont cultivées à 28°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 Ruthénium 0.05% pendant 30 minutes. Un halo clair autour des colonies indique la présence d'une Polygalacturonase .

III-3-3- 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 laisser 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 .

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I-Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats

Sur le nombre total des nodules récoltés (27 nodules) à partir des racines d'*Astragalus gombo*, nous avons tenu compte de 05 isolats dont les colonies absorbent très peu le rouge Congo (**Tableau 02**).

Les autres colonies contaminantes sont fortement colorées et acidifient lentement le milieu

Glucose-Peptide-Agar en présence du Pourpre de Bromocrésol .

Tableau 02: les souches et les souches de références utilisées dans cette étude.

Code de la souche	Nom de la souche	Plante hôte	Origine géographique	Source
R ₂	Isolat	<i>Astragalus Gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
R ₆	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
R ₈	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
S ₄	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude
S ₅	Isolat	<i>Astragalus gombo</i>	El choucha El hadjeb willaya de Biskra	Notre étude

A ₀₆	Rhizobium sullae sp.nov.RHA6	H.Coronarium	Constantine Algérie	A.Benguedouar - Algérie
HCNT1	R.sullae HCNT1	H.Coronarium	Volterra ,Italie	S.Casella- Pise

I-1 Croissance des isolats sur YMA

Après l'écrasement de toutes les nodules récoltés et l'ensemencement, les 05 boîtes ayant donné des colonies ,après 72 heures ,sur le milieu YMA , elles ont une couleur blanche ou crème, forme convexe et un aspect lisse brillant avec une texture translucide (**Photo 03**). Ce résultat est en accord avec le résultat de **TORCHE (2006)** .

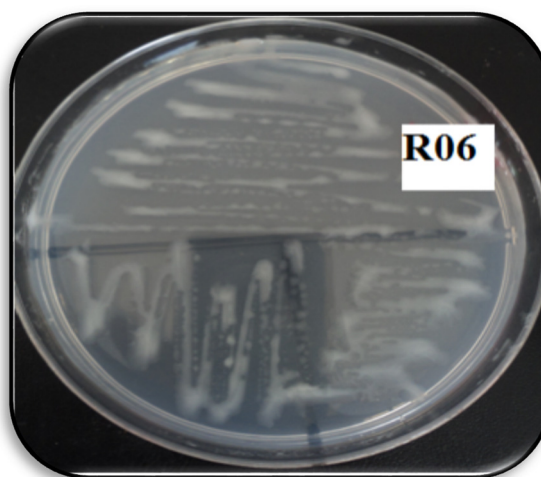


Photo 03 : Aspect des colonies sur YMA (isolat R06).

I-2- Croissance des isolats sur YMA+ Rouge Congo

Les souches isolées à partir des nodules d'*Astragalus gombo* apparaissent avec une couleur rosâtre et absorbent peu le rouge Congo sur milieu YMA (**photo 04**). Ceci est le caractère général du genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (**VINCENT, 1970**). Ce résultat est concordance avec le résultat qui est déclarée par **KNEEN et La RUE (1983)** .

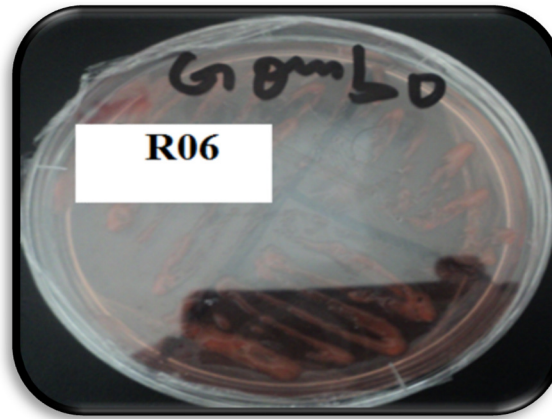


Photo 04 : Aspect des colonies sur YMA + Rouge Congo (isolat R06).

I-3-Examens de la mobilité

Après avoir réaliser l'ensemencement des isolats sur le milieu Mannitol mobilité incubé à 28°C pendant 48h, on observe un changement de couleur du rougeâtre vers la couleur jaunâtre dans l'isolat R06 et diffusion dans la milieu , par contre les isolats R02 , S04,S05 ont un changement faible de la couleur rougeâtre vers la couleur jaunâtre. L'isolat R08 ne modifie pas le couleur rouge . Donc l'isolat R08 non mobile et n'acidifier pas le milieu donc ne fermente pas le mannitol ,les isolats précédantes peu acidifient le milieu donc fermentent faiblement le mannitol. Le seule isolat R06 est mobiles avec une acidification du milieu indiquant que le isolat fermente le mannitol (**Photo 05**). Ces résultats sont conformés à ceux de **CHABBI (2010)**.

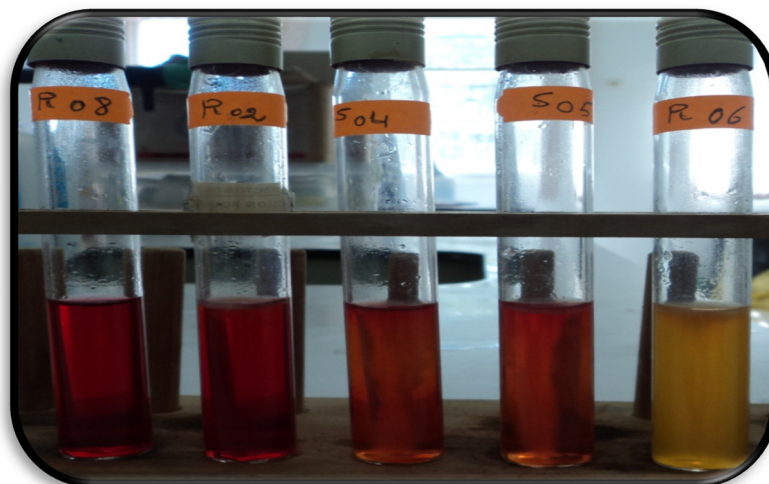


Photo 05 :Examen de la mobilité .

I-4-Examen microscopique par coloration de Gram

Suite à la coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé des bâtonnets roses (**Photo 06**). Cette bactérie se classe donc parmi les bactéries Gram négatif (-), cela prouve que les isolats isolées appartient au genre *Rhizobium*. Ces résultats sont en concordance avec l'étude de **SOMASEGARAN et HOBEN (1994)**.

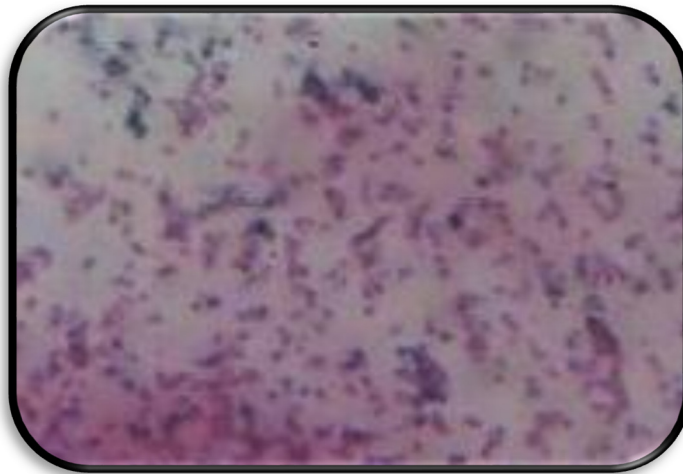


Photo 06 : Coloration de Gram des isolats.

I-5-La vitesse de croissance

En prenant comme critère de croissance, nos isolats donnent des colonies visibles après 3 jours d'incubation à 28°C, ce qui indique que les isolats présentent une croissance rapide. Cette constatation est confirmée par les deux tests suivants :

- 1- Nos isolats modifient le pH sur le milieu Glucose Peptone Agar (GPA) additionné de Pourpre de Bromocrésol (BCP) après 24 h (**VINCENT ,1970 et 1982 ; JORDAN, 1984 ; CHEN et al., 1991**) (**photo 07**) .
- 2- D'autre part nos souches appartiennent à un genre de bactérie à croissance rapide puisque le milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB) est acidifié après 24h d'incubation (virage au jaune de l'indicateur de pH visible dans la **Photo 08** .

Ainsi le BTB est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique, une réaction acide se traduit par le changement de la coloration BTB vert vers le jaune (**EL HILALI, 2006**), ainsi (**BECK et al., 1993**) considèrent les *Rhizobium* à croissance rapide changent la couleur bleue vers le jaune, par contre les *Rhizobium* à croissance lente

alcalinisent le milieu qui se traduit par un renforcement de la coloration bleue (**JORDAN, 1984**).

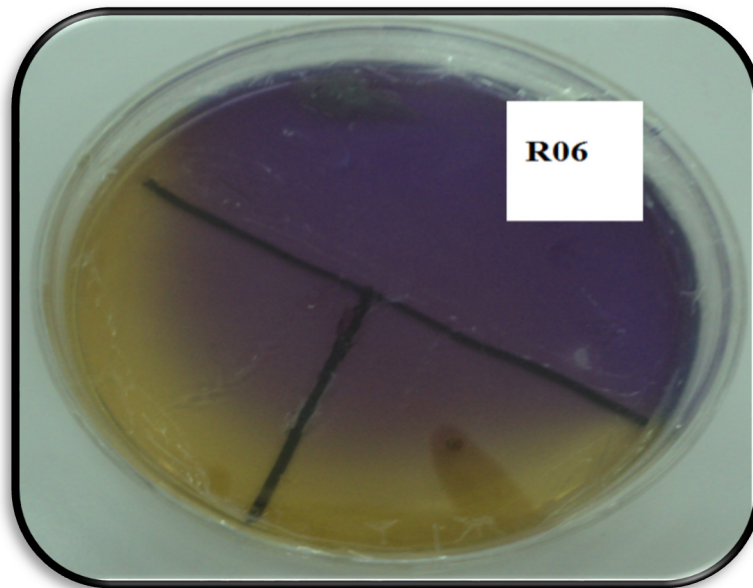


Photo 07: Aspect des colonies sur GPA+BcP (R06).

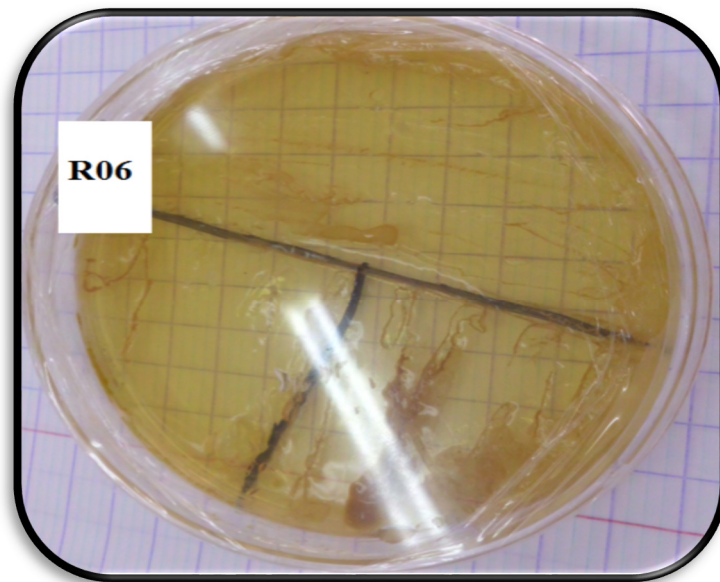


Photo 08 : Aspect des colonies sur YMA+BTB(R06) .

II- Test nutritionnel

II-1- Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Après incubation, on remarque que tous les isolats, assimilent bien les sucres simples

(glucose , galactose et fructose), on enregistre une assimilation faible des sucres composés (saccharose et maltose) avec les isolats.

Toutefois, les *Rhizobium* diffèrent dans leur aptitude à assimiler les différentes sources de carbone . Les mesures de la densité optique montrent que les deux souches **R₀₆** et **S₀₄** assimilent le glucose préférentiellement comme les deux souches de référence **A6** et **HCNT1**. D'autre part nous avons signalé que les isolats **S₀₅** , **R₀₂** , **R₀₈** assimilent bien le galactose ,le glucose, le saccharose, même resultat et pour les souches de référence par ce qu'elles utilisent toutes les sucres avec une préférence au fructose. Le glucose est le sucre le mieux assimilé en particulier par **R₀₂** , **R₀₆**, **R₀₈** . Tandis que le saccharose est assimilé de préférence par **S₀₄** , **S₀₅** . On remarque que le maltose est le sucre le moins utilisé par tous les isolats (**Figure 11**).

Ce résultat se concorde avec les travaux des auteurs suivant (**ALLEN et ALLEN, 1950 ; STOWERS, 1985**) prouvant que 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. 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.

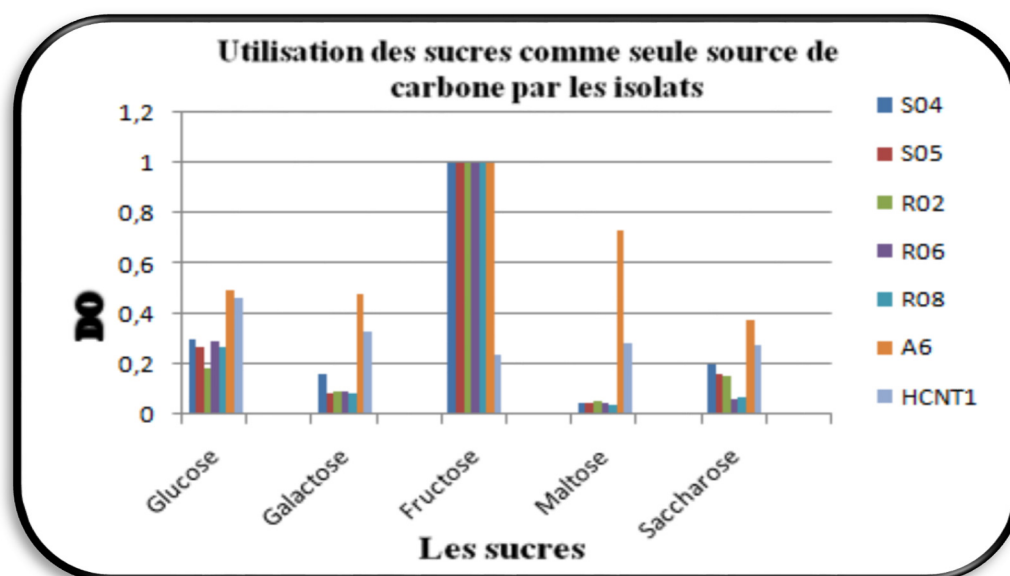


Figure 11: Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats .

III-Tests physiologiques

III-1-Effet de la température

Seulement les deux souche R_{02} et R_{06} (**Photo 09**), (**Photo10**), (**Photo11**) et (**Photo12**) sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 28°C avec une croissance optimal dans l'intervalle de 20°C à 28°C les deux isolats R_{02} , R_{06} sont similaire avec les deux souches de référence A6 et HCNT1 de croître à une température optimal le tableau (**Annexe 5**) . De la température , 4°C à 37°C la croissance n'est pas observée chez des souches S_5 et R_8 . On remarque également une croissance faible chez le isolat R_2 à 4°C l'exception est remarqué avec l'isolat S_{04} qui vivre seulement dans la température 37°C . Ces résultats sont concordance avec les résultats de **GRAHAM (1992)** qui montre que les *Rhizobia* sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C .

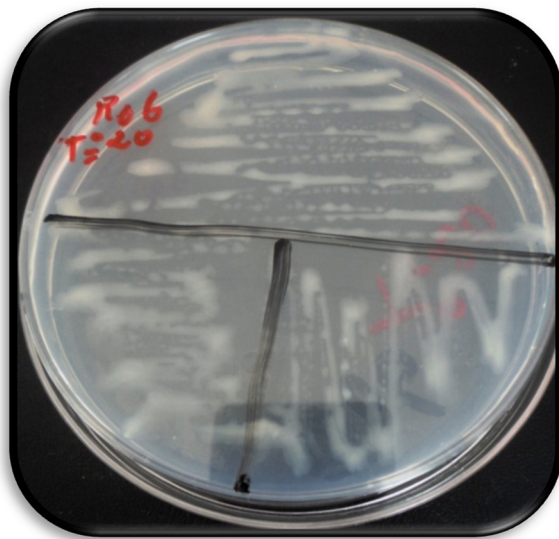


Photo 09: Effet de la température 20°C .

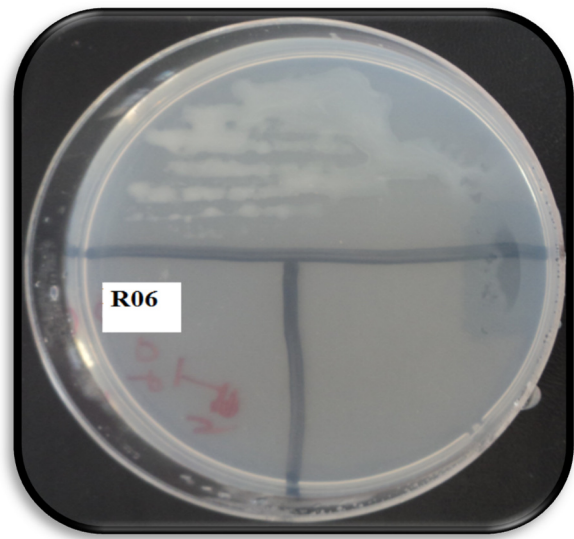


Photo 11 : Effet de la température 4°C .

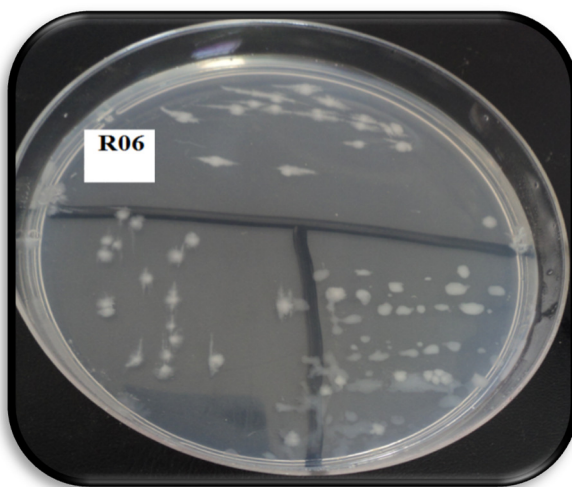


Photo 10: Effet de la température 28°C .

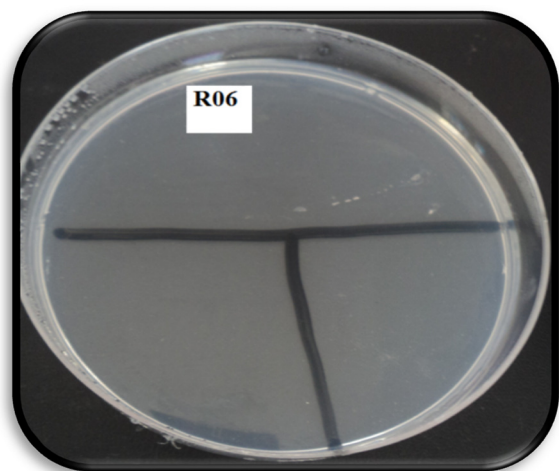


Photo12 : Effet de la température 37°C .

III-2-Effet de pH

Les résultats de l'effet des pH acides et alcalins de l'ensemble des souches de la collection sont présentés dans le tableau (**Annexe 5**). D'après l'histogramme, on remarque que la totalité des isolats poussent dans l'intervalle de pH=5 et pH=8. Une croissance importante est enregistrée avec le pH=6,8, c'est le pH optimum de la croissance du *Rhizobium* (**Figure 12**) (**SOMASEGARAN et HOBEN, 1994**). Les pH alcalins sont les plus tolérés que les pH acides. Toutes les souches ont pu tolérer la grande valeur de pH testée qui est de 8. La tolérance à l'acidité s'est révélée par contre très variable avec des pH comprise entre 5 et 6. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **JORDAN (1984)** et **BECK et al., (1993)** et **El Hillali (2006)** qui ont rapporté une tolérance allant du pH=5 au pH=9,5 pour des souches isolées de plusieurs espèces. Ce test est répété une deuxième fois afin de corriger les erreurs de la lecture des échantillons de pH=8 par le spectrophotométrie et les tubes à vis sont manqués pour faire la dilution.

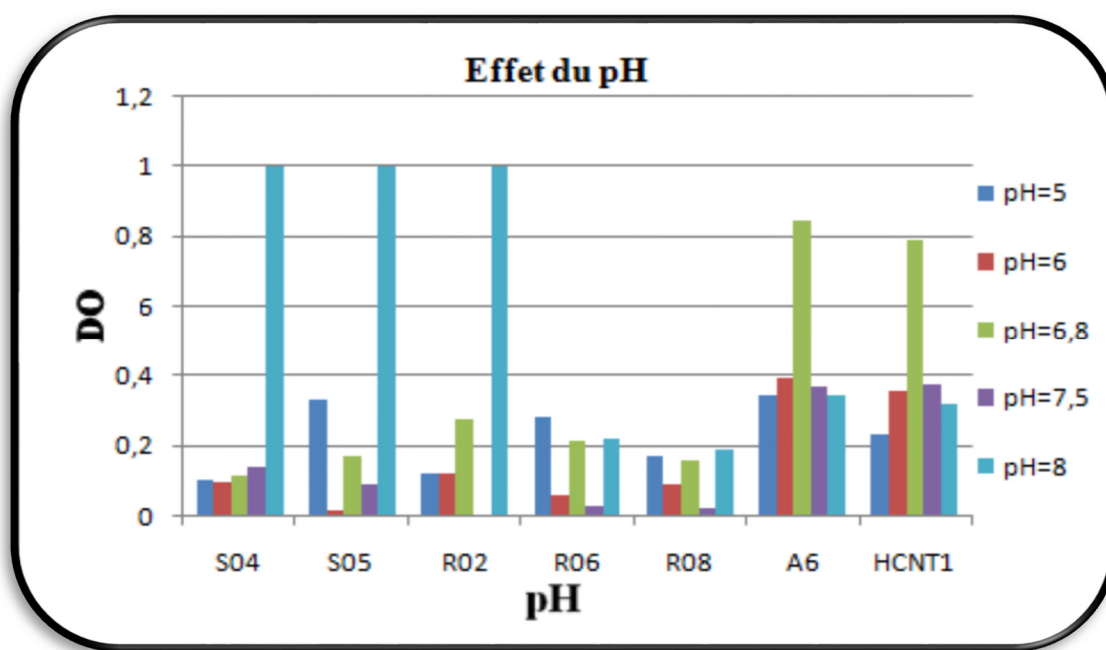


Figure 12: Effet du pH.

IV- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)

IV-1- Réduction des nitrates

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur plantes hôtes. Le nitrate est réduit en nitrite par le nitrate réductase qui catalyse la réaction suivante :



Après l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs nitrate réductase **I** et **II** (**Annexe 4**) les isolats **S₀₄**, **S₀₅**, **R₀₂**, **R₀₆**, **R₀₈** ne donnent pas le couleur rouge ou rose ,indiquant la non réduction des nitrates (**Tableau 03** et **photo 13**) .On doit ajouter la poudre de zinc, pour confirmer la possession ou non de l'enzyme mais malheureusement ,cette poudre est déficiente au niveau de laboratoire .Donc nos résultats n'accord pas avec les résultats de **GHARZOULI (2006)** qui va rapporter que les souches donnent des colorants rougeâtres ,elles possèdent donc une enzyme nitrate réductase qui catalyse la réduction de nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-). Il est bien connu que le nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses (**LUCIŃSKI et al., 2002**). L'aptitude à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière (**EL HILLALI, 2006**).

Tableau 03 : Réduction des nitrates.

	S₀₄	S₀₅	R₀₂	R₀₆	R₀₈
Réduction de nitrates	-	-	-	-	-

NB : (-) : négative , ne peut pas confirmer la réaction négative des souches parce que le poudre de Zinc pure est manque.

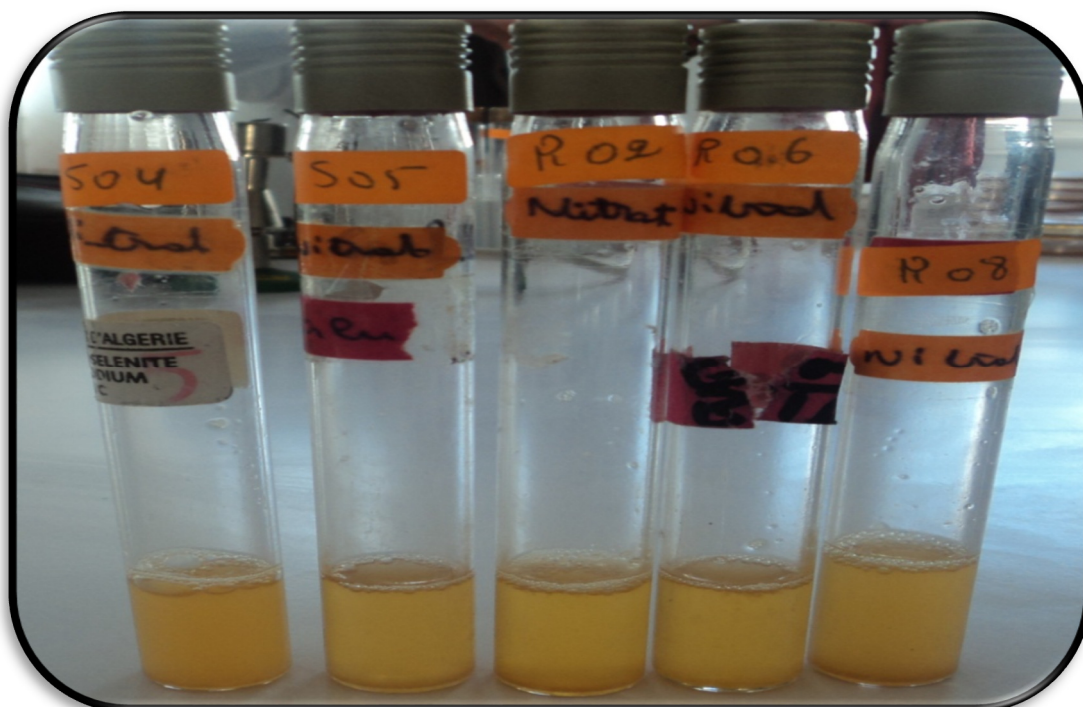
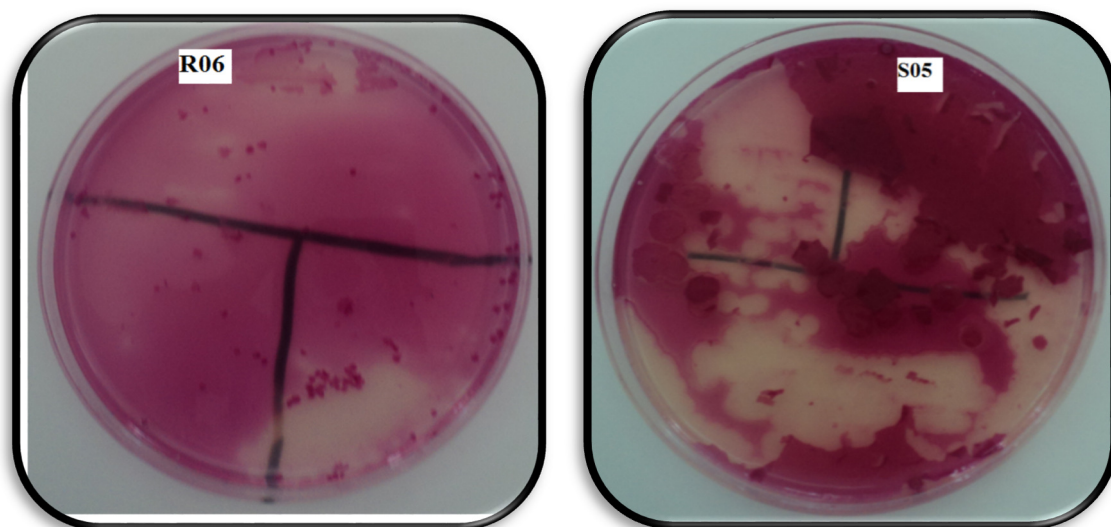


Photo 13 : Réduction des nitrates (isolats **S04 S05, R02 , R06, R08**).**IV-2- Activité pectinolytique**

Après addition du rouge de Ruthénium et le rinçage avec de l'eau, un halo clair (**Photo 14**) est observé autour des colonies indiquant une réaction positive est représentée dans le (**Tableau 04**). Tous les isolats ont une activité polygalacturonasique. Deux enzymes : endoglucanase et polygalacturonase, dégradant les ponts glucidiques de la paroi cellulaire secrète par l'espèce du *Rhizobium sullae* . Nos résultats sont en accord avec les travaux sur le *Rhizobium sullae* de **STRUFFI et al ., (1998)**.

Tableau 04 : Activité pectinolytique .

	S04	S05	R02	R06	R08
Activité pectinolytique	+	+	+	+	+

**Photos 14** : Activité pectinolytique.**IV-3-Activité cellulolytique**

Après l'incubation des boîtes qui sont rincées avec l'eau courante puis inondées avec la solution de NaCl pendant 30 mn. On remarque chez les isolats l'absence d'un halo jaune orangé autour des colonies (**Photo 15**) indique l'absence d'une endoglucanase (cellulase) donc

l'activité cellulolytique est négative. D'autre part nous avons signalé que les isolats S₀₄, S₀₅, R₀₂, R₀₆, R₀₈ sont similaires aux souches de références A6 et HCNT1 parce qu'elles ne donnent aucune activité cellulolytique (**Tableau 05**). Nos résultats obtenus sont en accord avec **BENHIZIA, 2006**) qui rapporte que les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* laissent apparaître une activité cellulolytique négative.

Tableau 5 : Activité cellulolytique .

	S ₀₄	S ₀₅	R ₀₂	R ₀₆	R ₀₈	A6	HCNT1
Activité cellulolytique	-	-	-	-	-	-	-

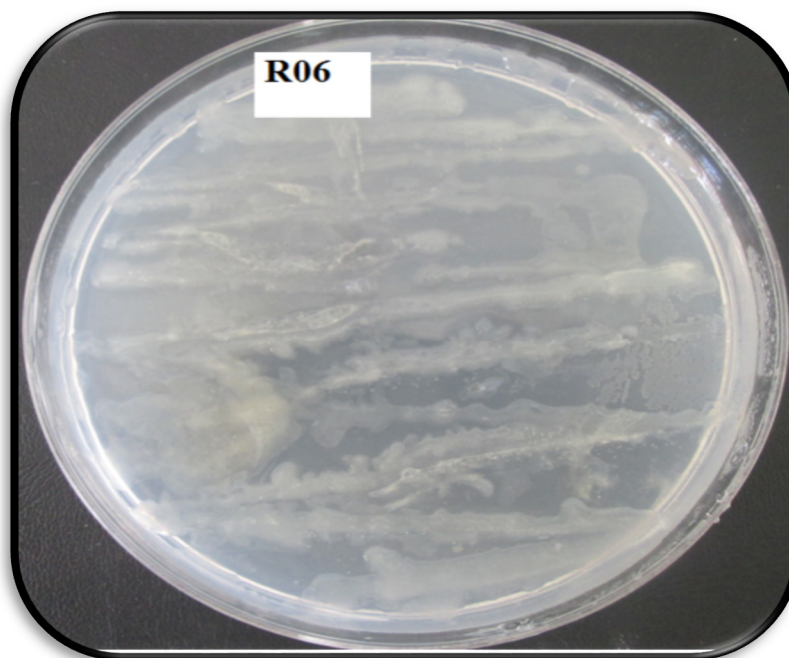


Photo 15 : Activité cellulolytique .

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- ALLENE.K., AND ALLENO.N., 1950:** Biochemical and Physiological properties of the rhizobia. Bacteriol.Rev. 14 pp 173-330.
- ANNONYME., 2011 :** Télomères, télomérase et vieillissement L'astragaloside IV, un activateur de la télomérase . Nutra news : science,, p. 6.
- ANNONYME., 2014 :**www.crstra.com.
- BECK D.P., Materon L.A ., AFANDI F. 1993 :** paractical Rhizobium- Légume. Technology Manual. ICARDA, Syria, P.290.
- BENAHMED A. 2010.** Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium* .Mémoire de Magister .Université Mentouri Constantine, Algérie, p.18
- BENHIZIA Y. 2006 :** Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre Hedysarum: *H.carnosum* Desf., *Hspinossissimum* subsp.capitatum Desf. Et *H.pallidum* Desf. Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine.
- BERRADA H., FIKRI-BENBRAHIM K. 2014 .** Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. Science Domain international. 4(6): 616-639
- BOTINEAU M . 2010.** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs , Lavoisier, Paris ,pp.607-610
- BREWEN NJ., DOWNIE J.A., YOUNG J.P.W. 1992.** Nodule formation legumes.Encyclopedia capitatum Desf. et *H. pallidum* Desf. Thèse de Doctorat d'Etat en Microbiologie appliquée de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.
- CHABBI R. 2010 :** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est Algérie. Thèse de magister, Université Mentouri Constantine,Algérie, p.111.
- CHEHMA AM. 2006.** Catalogue des plantes spontanées du sahara septentrional Algérien. Ed.Dépot légal. p. 82.
- CHEN, W. X .; G. S. QI ; E.T. WANG ; H.L. HUAN AND J.L LI .1991.** Rhizobium huakii sp. nov.isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 275-280
- DAVET P. 1996 :** Vie microbienne du sol et production végétale. Inra, Paris, France , pp.145-161.
- DEBELLE F., MOULIN L., MANGIN B., DENARIE J., BOIVIN C. 2001.** nod Genes and Nod signals And the evolution of the rhizobium legume symbiosis. Acta Biochimia Polonia Mini review.48(2) : 359-365.
- DELEGLISE A. 2001.** Vers une diminution de l'utilisation d'engrais azoté. ouébec science.

DENARIEJ. 2000 : Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de des charançons de la famille des Dryophthoridae. Thèse de Doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon. France.

DOMERGUE .2006: Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Edition espaces 34(CIRAD,FAO,IRD).

DUPHOUX E., NICOLE M. 2004 : Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Dunod , Paris .France, pp.1-20.

EL HILALI. 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, PP.1-205.

FOTH H. D. 1990 . Fundamentals of soil science. Henry, D. Foth , John Wiley & sons, France.

GHARZOULI R., 2006 : Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. Mémoire de Magistère, Université Mentouri de Constantine , Alger, p 96.

GRAHAM, P.H.1992 . Stress tolerance *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under des charançons de la famille des Dryophthoridae. Thèse de Doctorat de l'Institut national des développement . Conférence débat de l'ORSTOM. Paris X e, P.15.

HAYNES R.J.1986. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. Can. J.Microbiol. 36: 864-896.

HOPKINS W.G. 2003. Physiologie végétale. Edition de boeck. Université des Sciences et Technologie de Lille, pp. 99-119.

Howard JB, et D.C. Rees .2000 . Structure of the nitrogenase protein components. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific .

Howard JB, et D.C. Rees .2000. Structure of the nitrogenase protein components. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific.

Jordon, D.C. 1984 . Fammilly III. Rhizobiaceae. In: N.R. Kreig and JH Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. The Williams & Wliams Co. Baltimore. pp. 234-254.

KNEEN B.E ., LA RUE T.A. 1983. Congo red absorption by *Rhizobium* *leguminosarum*. Applied and environmental microbiology. 45(1): 340-342.

LEFEVRE C. 2004 . Caractérisation et phylogénie des bactéries symbiotiques intracellulaires

- Luciński, R. ; W. Polcyn; L. Ratajczak .2002 :** Nitrate reduction and nitrogen fixation in l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- MADIGAN M., MARTINK J. 2007 .** Brock biologie des microorganismes 11^e édition. Edition Person Education France, pp.599-601,676-681.
- Michelle I., Lindeque. 2006 :** Diversity of root nodule bacteria associated with *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* species in south Africa. University of Pretoria.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B., and Boivin-Masson C.2001:** Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. Nature N° 411 , pp. 948-950.
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. 1995 :** Symbiot nitrogen fixation. Plant Cell .pp. 869-885.
- Nabors M. 2004.** Biologie végétale (structures, Fonctionnement écologie et biotechnologies), Edition PEARSON . pp. 224-225.
- Newton W.R. 1998.** Nitrogénase : fonction et évolution. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 13 : 238-
nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp.
of microbiology. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York ,3pp. 239-248.
Orlando , PP.1-15
- OZENDA P. 1991.** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, CNRS, Paris, p. 279.
- PELMONT J.1995 .** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Vol. 2, Office des Publications Universitaires. pp. 541-572.
- PERET B. 2007.** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III , France , p. 3.
- PERRY JJ., STALEY JT., LORYS. 2004 .** Microbiologie, Dunod, Paris, p. 617.
- QUEZEL P., SANTA S. 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I , CNRS, Paris, France, p. 551.
- Raven PH., Evert RF., Eichhorn SE. 2000 .** Biologie végétale. 6^e édition, De boeck université s.a, Paris, p.736.
- Raven., Evert., Eichhorn. 2007:** Biologie végétale. 2e édition. Edition de boeck. Paris France, pp .653-660.
- RICHTER G. 1993.** Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Press polytechnique et universitaire, Lausanne , pp. 187-222.
- ROGER P.1996.** La fixation biologique de l'azote . quelles potentialités pour le developpement ? Conference debat de l'ORSTOM. Paris X France.
- SAOUDI , M. 2008 .** Les bactéries nodulant les legumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus* . Mémoire de Magister . Université de Mentouri Constantine. Algérie .

Sebihi F . 2008 . Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum* . Thèse de Magistère , Université Mentouri Constantine , Algérie , pp. 22-23.

Somasegaran P et Hoben H.J .1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage New

Somasegaran P., Hoben H.J. 1985. Methods in legumes-rhizobium technology. Niftal. sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 51:1729-1735.

StowersM.D.,1985: Carbon metabolism in Rhizobium species. Ann.Rev.Microbiol. 39, pp

STRUFFIP.,CORICHV.,GIACOMINIA.,BENGUEDOUARA.,SQUARTINIA.,CASELLA S.,NUTIM.P. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*.Journal of Applied Microbiology. 84(1) pp 81-89. symbiotic association Rhizobium-legumes. Acta Biochimia Polonia.49 (2): 537-546.

Terefework Z. 2002 .Diversity and phylogeny of Rhizobium galegae ,and reflections on supporting bacteria Current Science, Vol. 89, N°1.

TEYEB H ., HOUTA O., DOUKI W ., NEFFATI M . 2012 .Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Astragalus gombo* collectée à partir de deux sites de la Tunisie . Journal de la Société Chimique de Tunisie,14 :63-67.

Torche A. 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum* . Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine , Algérie, p.166.

Tortora G.J., FunkB.R.,CaseC.L. 2003: Introduction à la microbiologie. Edition du Transduction of rhizobial NOD factors. Crit. Rev.Plant Sci. 20 : 373-394.

Université Mentouri Constantine, Algérie, p. 111.

VINCENT J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria.IB.P. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.N°15.p.164.

Waligora Cecile.,Tetu T.2008 . Legumineuses il est urgent de les réhabiliter. Edition York. Inc . p.450.

Zakhia F., 2004. Diversité des bactéries hotes de légumineuses mediterraneennes en Tunisie et au Liban. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, France , P. 9

Zakhia, F and de Lajudie P.,2004 .Characterisation of wild legumes nodulating bacteria (LNB). In the infrared zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. 27: 143-153.

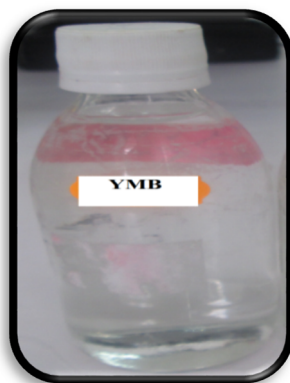
ANNEXES

Annexe1

Milieux de culture et solutions utilisés

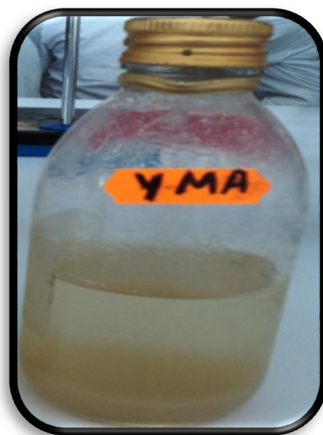
- **Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent,1970)**

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000 ml (1.0 litre)
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.



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

YMB	1000 ml
Agar	15
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

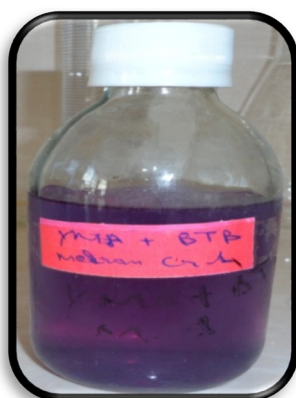
Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100 ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar .



- **Composition de milieu YMA+ bleu de bromothymol en g/l**

YMB	1000 ml
Solution stock de bleu de bromothymol	15 ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10 ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100 ml 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	10 ml
Eau distillée	1000 ml
Agar	18
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 du milieu.



- **Milieu Mannitol Mobilité**

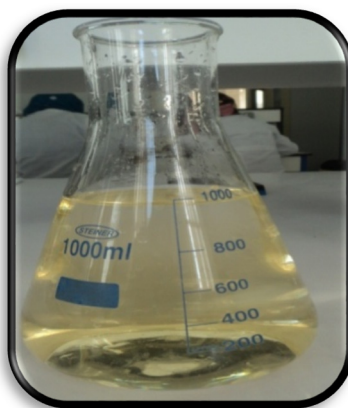
Caséine	9,7 g /l
Peptone	4.3 g /l
Nitrate de potassium	2,3
Mannitol	3
Rouge de phénol	0,04
Agar	2,7
L'eau distillé	1000 ml



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

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ . H ₂ O	0.87
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.



Annexe2

- **Examen microscopique par la coloration de Gram**

A partir des cultures sur YMB on prépare des lames pour la coloration de Gram.

Sous la hotte à flux laminaire, la préparation est étalée en couche mince , séchée et fixée.

Les lames sont déposées sur un support.

Les étapes de la coloration :

- ❖ Recouvrir le violet de gentiane, laisser agir 1minute.
- ❖ Verser sur la lame la solution iode et laisser agir 30 secondes.
- ❖ Incliner la lame et laisser tomber la goutte à goutte l'alcool-acétone.
- ❖ Laver avec de l'eau distillée.
- ❖ Recolorer avec de la fuschine, laisser agir 1minute.
- ❖ Laver avec de l'eau distillée.
- ❖ Observer à immersion.

Annexe 3

Matériels utilisés



Autoclave



Etuve



Spectrophotométrie



Agitateur-plaque chauffante



Vortex



PH mètre ajusté à 6,8

Annexe 4

- Test de PH



- Test de réduction nitrate

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

Réactif II : α naphthylamine à 0,5% l'acide acétique dilué au même temps.



Résumé

D'une vingt sept souches isolées à partir des nodules des la légumineuse fourragères *Astragalus gombo* 5 souches sont sélectionnées, après une étude culturale on a isolé 5 souches, les 5 isolats sont identifiés par un examen microscopique (coloration de Gram) et examen de mobilité (mannitol mobilité). La croissance des isolats sur les milieux sélectives classe ces *Rhizobia* parmi le genre de *Rhizobium* à croissance rapide.

Les souches isolées sont caractérisées par une étude phénotypique (tests physiologiques et nutritionnel et tests biochimiques) et montrent que la température optimal dans l'intervalle de 20°C à 28°C et le pH optimum est de 6.8 et aussi tolèrent des milieux acides et alcalins. On remarque que les bactéries dans leur majorité ont une réduction des nitrates négative, ainsi qu'une activité pectinolytique positive et cellulolytique négative.

Mots clés : Légumineuse, *Astragalus gombo*, Nodules, *Rhizobium*.

Summary

Of a twenty seven stocks isolated starting from the nodules as of the leguminous plant fodder *Astragalus gombo* 5 stocks are selected, after a farming study one insulated 5 stocks, the 5 isolates are identified by a microscopic examination (coloring of Gram) and examination of mobility (mannitol mobility). The growth of the isolates on the mediums selective classifies these *Rhizobia* among the kind of *Rhizobium* with rapid growth.

The isolated stocks are characterized by a study phenotypical (physiological tests and nutritional and biochemical tests) and show that the temperature optimal in the interval of 20°C at 28°C and the optimum pH is of 6.8 and also tolerate acid media and alkaline. It is noticed that the bacteria in their majority have a negative reduction of nitrates, as well as a positive and cellulolytic activity pectinolytic negative.

Key words: Leguminous plant, *Astragalus gombo*, Nodules, *Rhizobium*.

ملخص

تم عزل 27 عينة بكتيرية من العقد الجذرية للبقوليات الرعوية من نوع *Astragalus gombo* . بعد دراسة زراعية قمنا بعزل 5 عينات تمت ملاحظتها مجهريا (بتقنية التلوين Gram) واختبار ها بتقنية Mannitol mobilité .

نمو العينات على الاوساط المختارة صنف هذه الريزوبيا ضمن جنس الريزوبيوم ذو النمو السريع. العينات المعزولة ميزت بدراسة مظهرية غذائية وبيوكيميائية وبيئت ان الحرارة المثالية هي بين 20° حتى 28° مئوية وتنمو ايضا في درجة الحموضة المثالية هي 6,8 وايضا تنمو في الاوساط الحمضية والقاعدية. نلاحظ ان البكتيريا في معظمها ليس لها خاصية ارجاع النيترات واستعمال السيليلوز ولها خاصية استعمال البكتين .

الكلمات المفتاحية : بقوليات , *Astragalus gombo* , عقيدات , بكتيريا عصوية الشكل .