

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 phénotypique des bactéries
nodulant la légumineuse *Astragalus armatus*
de la région d'El hadjeb-Biskra.**

Présenté par : BOUSBIA Meriem

Devant le jury:

Président: ATTIR Badereddine

Promoteur: MOKRANI Djamila

Examineur : BEDAIDE Ibtissam Kahina

Année Universitaire 2013/ 2014

Remerciements

Avant tout je remercie DIEU (Allah) tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail

je remercie particulièrement :

M^{me} Mokrani Djamilia, enseignante dans le département des sciences de la nature et de la vie de l'université de Biskra d'avoir bien voulu diriger ce travail et pour tous ses conseils fructueux et ses encouragements

Tous d'abord les membres du jury: ATTIR Badereddine et BEDAIDA Ibtessam Kahina pour leur investissement dans l'évaluation de cette mémoire.

A tout les professeurs de département des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, les responsables des laboratoires et ceux de la bibliothèque pour leurs aides.

A Les responsable De Centre De Recherche (C.R.S.T.R.A).

Les responsables de laboratoire médicale d'El Oued M^{lle}, Gezi Waffa et Drihem Soumia.

Au terme de ce travail, il est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Avec l'aide de (Allah) le tout puissant est achevé le présent
travail qui je dédie :*

A la mémoire de mon père qui dieu ait son âme.

*A ma source d'amour et d'affection, pour leur sacrifice,
encouragement et soutient tout au long de mes études, à toi ma mère .*

A la lumière des mes yeux,

à mes frères : Abdel khader, Alazhar, Hassane, Hossine, Hamza et Ossama.

Ames soeurs : Maissaa, Messouda, khadidja Metira et Chaima.

A la lumières de maison: Mohammed etTadj edine.

Et a tous la famille Bousbia et Toiti

*A mon idéales qui avec elles j'ai passée les beaux et les difficiles
moments :Hanane , Fatima, Soumia , Wafa, Beshira, Khadidja, Zineb, Manel,*

Karima, et Djannete

A tout mes collègues sans exception : Azmi, Afaf, et Wassila

A tous mes amis.

Meriem

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Azote.....	4
I.1 Cycle d'azote.....	4
I.1.1 Ammonification.....	5
I.1.2. Nitrification.....	5
I.1.3. Dénitrification.....	5
I. 2. La fixation d'azote.....	6
I. 2.1 La fixation biologique de l'azote.....	6
I.2.2. La nitrogénase.....	7
I.2.3. La léghémoglobine.....	7
I.3 Génétique de la fixation.....	7
I.4. Mécanisme de la nodulation.....	8
I.4. 1. Formation des bactéroïdes.....	8
I.4.2. Les étapes de la nodulation.....	9
II . Les légumineuses.....	11
II.1. Intérêts des légumineuses.....	11
II. 2. Classification de légumineuse.....	12
II.3. Le genre Astragalus.....	13
II.4. Intérêt médical du Genre.....	15
III. Le microsymbiont (BNL).....	16
III.1. Bactéries Nodulant les Légumineuses.....	16

III.2.La taxonomie bactérienne.....	16
IV. Biodiversité des rhizobia.....	24
IV.1.Méthodes d'étude de la diversité.....	24
IV. 1. 1 . Les marqueurs phénotypiques.....	24
IV.1.2. Les marqueurs moléculaires.....	25

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Isolement des bactéries nodulant <i>Astragalus armatus</i>.....	27
I.1. Collecte des nodules.....	27
I.2. Conservation des nodules.....	28
I.3. Isolement des souches à partir des nodules.....	30
I.3.1. Stérilisation de nodules.....	30
I.3.2. Ecrasement des nodules.....	30
I.3.3. Isolement des souches.....	30
II. Caractères cultureux.....	31
II.1. Principaux milieux de culture utilisés	31
II.2. Purification des isolats.....	32
II.3. Examens microscopiques (Coloration de Gram).....	32
II. 4. Examen de manitol mobilité.....	32
II.5. Conservation des souches.....	32

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Caractéristiques morphologiques et cultureux des isolats.....	37
I.1. Croissance sur YMA.....	38
I.2. Croissance sur YMA + Rouge Congo.....	38
I.3. Croissance sur GPA+BcP.....	38
I.4.La vitesse de croissance	38

I.5.Examen microscopique.....	41
I.6.Test de manitol mobilité.....	41
II. Caractérisation phénotypique des bactéries.....	42
II.1.Test nutritionnel.....	42
II.1.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone.....	42
II.2. Test biochimique (recherche de certains enzymes).....	43
II.2.1.Réduction des nitrates.....	43
II.2.2. Activité pictinolytique.....	44
II.2.3. Activité cellulolytique.....	45
III.3.Test physiologiques	47
III.1. Température de croissance.....	47
III.2 Effet de pH.....	49
IV .Résistance aux métaux lourds	50
Conclusion	
Référence bibliographique	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau1. 1 : Composition des réserves de quelques gaines d'espèces cultivées (LAZREK BEN FRIHA, 2008).....	11
Tableau1. 2: Classification de <i>Rhizobia</i> (BERRADAet FIKRI-BENBRAHIM, 2014)...	17
Tableau3.3: Isolats et Souches de référence utilisées dans cette étude.....	37
Tableau 3.4: Caractères culturaux des souches nodulantes après 5 jours d'incubation à 28°C.....	40
Tableau 3.5: Les résultats des tests biochimiques.....	46
Tableau 3.6: Température de croissance testées.....	47
Tableau 3.7: Résistance de souches aux métaux lourds en µg/ml.....	50

Liste des figures

Figure1.1: Cycle de l'azote (TORTOA et al., 2003).....	4
Figure1. 2 : Processus de la nodulation (GILES et al., 2004).....	9
Figure1.3: Classification des légumineuses (DOLY et al, 1998).....	12
Figure1. 4: <i>Astragalus armatus</i>	14
Figure 2.5 : Collecte des nodules <i>Astragalus armatus</i>	28
Figure 2. 6: Rinçage des racines et nodules (Photo D.P. BECK, 1993).....	28
Figure 2.7 : Conservation des nodules sous CaCl ₂	29
Figure2. 8: Stérilisation de nodules.....	30
Figure 2.9 : Ecrasement des nodules.....	30
Figure 2.10: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (VINCENT, 1970)...	31
Figure 2.11: milieu de TY.....	32
Figure2.12 : Conservation des souches.....	33
Figure 3.13: Caractère culturaux des souches isolées.....	39
Figure 3.14: Coloration de Gram.....	41
Figure 3.15: Résultat de manitol mobilité.....	41
Figure3.16: Utilisation des sucres par les souches isolé et les souches de référence.....	43
Figure3. 17: la réduction de nitrate.....	44
Figure 3. 18: Test pectinase positive (+).....	44
Figure3. 19: Test cellulase négative (-).....	45
Figure3. 20: Effet des températures.....	48
Figure 3.21: Effet du pH sur la croissance des souches isolé et les souches de référence.....	49

Liste des abréviations

% : pourcentage.

(-) : négative.

(+) : positive.

°C : degré Celsius .

A : *Astragalus armatus*.

ADN : acide désoxynucléique.

ARNr : acide désoxynucléique ribosomique.

ATP: Adénine triphosphate.

BcP : Pourpre de Bromocrésol.

BNL : bactéries nodulant les Légumineuses.

BTB : Bleu de Bromothymol.

C : Cytosine.

CaCl₂ : Chlorure de Calcium.

CaCO₃ : Carbonate de Calcium.

DO : densité optique.

é:électron .

Fix : Les gènes de la fixation de N₂.

G : Guanine.

GPA : Glucose Peptone Agar.

GPA : Glucose Peptone Agar.

Gram(-) : Gram négatif.

H₂O : l'eau.

H₂: Gaz d'Hydrogène.

j: jour.

KNO₃: Nitrate de potassium.

N : L'azote.

N₂O : Oxyde d'azote.

N₂ : L'azote atmosphérique.

NaCl :Chlorure de Sodium.

NB : Note a Bigné.

NH₃ : L'ammoniac.

NH_4^+ : Ion d'ammonium.

Nif : Les gènes codent pour la nitrogénase réductase.

nifD, nifH, nifH, nifk: sont des genes de la nitrogénase.

NO_2^- : Nitrite.

NO_3^- : Nitrates.

Nod : Le gène de nodulation.

p/v : poids par volume.

PCR: Polymorphism Chain Reaction

PHB : polyhydroxybutyrate.

RC : Rouge Congo.

Sym: Symbiose

T° : température.

TY : Tryptone Yeast.

YMA : Yeast Mannitol Agar.

YMB : Yeast Mannitol Agar.

Introduction

Introduction

Les légumineuses constituent une source importante de protéines et des lipides dans l'alimentation humaine et animale. 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 sien des quels ces bactéries transforment l' azote atmosphérique en une forme assimilable par les plantes (MYLONA *et al.*, 1995)

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 ammoniacque. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux.

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire Algérien. De nombreuses espèces de légumineuses sont utilisées comme ressources pour l'alimentation humaine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille ...) et animale (luzernes, trèfles, sulla...) (MOULIN, 2002).

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sousfamilles : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papillionoideae* ; la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous famille des *Papilionoideae*. Le genre *Astragalus*. Est réparti dans des régions climatiques méditerranéennes, le long des côtes Pacifiques de l'Amérique du Sud du Nord, et en Europe méridionale et l'Afrique du Nord.

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation des nodules. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte. Cette symbiose *Rhizobium*-Légumineuse actuellement dénommée Symbiose Légumineuse- Bactéries nodulants légumineuses - selon de LDJUDIE, (2006) fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, et joue donc un rôle écologique et économique considérable. En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* , *Bradyrhizobium* , *Blastobacter*, *Devosia* , *Burkholderia*, *Ralstonia* ainsi que certaines γ -protéobactéries (BENHIZIA et COL. 2004), forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes des légumineuses.

L'objectif de notre étude est la caractérisation phénotypique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère *Astragalus armatus*.

Ce travail consiste en une caractérisation phénotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de cette légumineuse fourragère.

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- ✓ Isolement des *Rhizobium* à partir des nodosités.
- ✓ Etudes morphologique et microscopique des isolats.
- ✓ Tests biochimiques (réduction de nitrate, activité pectinolytique, activité cellulolytique)
- ✓ Test nutritionnel (Utilisation des sources de carbone).
- ✓ Tests physiologiques (effet du pH, effet de température).
- ✓ Résistance aux métaux lourds.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Le cycle de l'azote est complexe puisqu'il faut intervenir de nombreuses étapes selon le principe des chaînes alimentaires (CLAUDE, 2004) dont l'ammonification la nitrification et la dénitrification (RAVEN et *al.*, 2000).

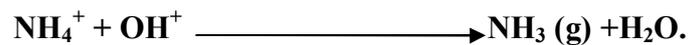
I.1.1 Ammonification

Lors de la décomposition d'un organisme végétal mort, les protéines sont hydrolysées en acides aminés ces derniers perdent leur groupement amine (NH_2), qui sont convertis en ammoniac (NH_3) ou cours d'un processus appelé désamination (TORTOIA et *al.*, 2003). Elle est assurée par une microflore nombreuse et hétérogène (CLAUDE, 2004).

La réaction chimique est

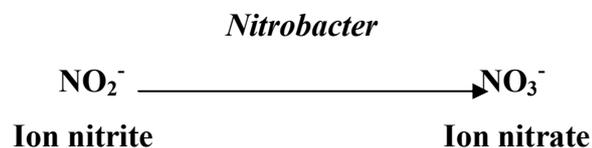
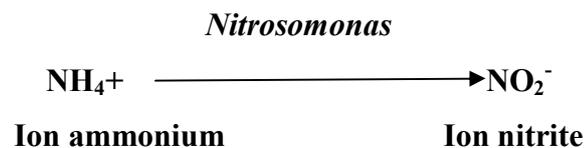


Dans les sols où le pH est élevé, l'ammonium se transforme en ammoniac gazeux:



I.1.2. Nitrification

La nitrification implique l'oxydation de l'azote, premièrement de l'ammoniaque en nitrite (RICKLFS, 2005) qui est couramment réalisé dans le sol bien drainé, à pH neutre, suite à l'activité des bactéries nitrifiantes (MADIGAN et *al.*, 2007). La première, la nitrosation, transforme la cation ammonium NH_4^+ en anion nitrite NO_2^- . Ceci est l'œuvre de *Nitrosomonas*. La deuxième étape, la nitration, fait passer le nitrite en nitrate NO_3^- . C'est *Nitrobacter* qui permet cette transformation selon la réaction suivante (CLAUDE, 2004):



I.1.3. Dénitrification

La dénitrification, est la réduction de nitrate en gaz, un faible pourcentage des nitrate précédemment formés est dégradé jusqu'au stade final d'azote moléculaire, reconstituant ainsi une partie de la réserve atmosphérique (MYERE, 2004). C'est la principale voie de transformation biologique de N_2 . Plusieurs micro-organismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas* (MADIGAN et *al.*, 2007).

La dinitrification se déroule comme suite:



I. 2. La fixation d'azote

I. 2.1 La fixation biologique de l'azote

L'utilisation de N_2 comme source d'azote cellulaire se nomme fixation d'azote (MADIGAN *et al.*, 2007).

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer le diazote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation d'azote est l'apanage du domaine des procaryote simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (HOPKINS, 2003). Ce sont des bactéries et des cyanobactéries vivant à l'état libre dans le sol ou éventuellement en association avec un végétal (MOUAFEK, 2010).

▪ Les fixateurs libres

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins, ainsi que ceux des eaux douces, et les sols. A ce groupe appartiennent des bactéries aérobies et anaérobies qui représentent des bactéries phototrophes (RICHTER, 1993) (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Clostridium*.....) (MADIGAN *et al.*, 2007).

et plusieurs genres des cyanobactéries principalement *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbia* et *Clostrix* (HOPKINS, 2003). Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et le toundra arctique est néanmoins considérable (TORTOA *et al.*, 2003).

▪ Les fixateurs symbiotiques

Plusieurs associations entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses sont bien connus. Dans les associations symbiotiques la plante représente l'hôte et le partenaire bactérienne le symbiote. (HOPKINS, 2003).

Les espèces fixatrice d'azote réellement, symbiotique sont nettement moins nombreux que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les *Rhizobium* des Actinomycètes (*Frankia*) et de cyanobactérie (*Anabaena Azollae*) (PELMONT, 1995). La bactérie de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes (TORTOA *et al.*, 2003).

I.2.2. La nitrogénase

Le processus de la fixation d'azote moléculaire de l'air a lieu au niveau des nodules, mais cette propriété est limitée aux bactéries fixatrices d'azote. La conversion de l'azote moléculaire en ammoniac est réalisée grâce à un complexe enzymatique nommée nitrogénase (DUHOX et NICOL, 2004).

La nitrogénase (ATP- dépendante), enzyme –clé de la fixation de l'azote, a été isolée des bactérie aérobies (*Azotobacter*) et anaérobie (*Clostridium*, de photobactérie (*Rhodospirillum*)) et de cyanobactéries, ainsi (*Rhizobium*, *Baradyrihizobium*) (RICHTER, 1993). Cette enzyme comprend deux métalloprotéines souvent nommées protéines II ou dinitrogénase réductase (homodimère de 64KD_a) et protéine I ou dinitrogénase .

I.2.3. La légghémoglobine

Dans les légumineuse , l'apport d'oxygène est régulé en grande partie par une protéine qui lie l'oxygène (HOPKINS, 2003): la légghémoglobine est une chromoprotéine dont le groupement prosthétique , ou hème est identique à celui de l'hémoglobine, mais dont la partie protéique, ou globine a une masse moléculaire de 17500Da (HELLER *et al.*, 1998) synthétisée par la plante hôte, il est localisé dans les cellules hôtes infectées par les bactéroïdes , la légghémoglobine peut constituer jusqu'à 30% de protéine de la cellule **hôte** (HOPKINS, 2003).

La synthèse de la légghémoglobine dépend des informations génétiques apportées par les plantes et la bactérie, aucun des deux partenaires n'étant capable de la produire indépendamment de l'autre (PERRY *et al.*, 2004) . Elle confère au nodule une couleur rose caractéristique lorsqu'une partie coupée est exposée à l'air (HOPKINS, 2003)

I.3 Génétique de la fixation

L'établissement de la symbiose entre *rhizobia* et la plante est un phénomène complexe. L'interaction symbiotique se traduit par la formation des nodules sous l'effet de différents facteurs:

- **Flavonoïde**

Il se trouve chez les végétaux, où ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les bactéries

Actuellement, de nombreuses espèces de flavonoïdes ont été caractérisées dans les exsudats racinaires, beaucoup d'entre elles stimulent la nodulation mais certaines espèces inhibent en fait le processus (HOPKINS, 2003). Les flavonoïdes activent le gène bactérien *Nod*, qui code pour les facteurs de nodulation Nod (HELLER et al., 2000). Ces substances attirent les rhizobies par chimiotactisme (DOMMERGUES et al., 1998).

- **Gène Nod**

L'infection et la formation des nodules des légumineuses sont contrôlés par un dialogue moléculaire entre les bactéries symbiotiques et la plante (DOMMERGUES et al., 1998).

En présence des substances indicatrices des racines (flavonoïde, bétaines), les protéines régulatrices synthétisées par *nodD* des bactéries sont activées et induisent les gènes de structure de la nodulation. Ceux-ci comprennent à la fois des gènes dits communs (A, B et C) rencontrés chez toutes les espèces de *Rhizobium* (DUHOX et NICOL, 2004). Elles sont impliquées dans la production d'oligosaccharides, appelés les facteurs Nod (MADIGAN et al., 2007).

Les gènes Nod sont localisés sur les grands plasmides *Sym*. Ces plasmides portant les gènes de spécificité définissent les spectres d'hôtes (PERRY et al., 2004).

- **Gène Nif**

Les gènes *nif* sont spécifiquement impliqués dans le processus de la fixation de N₂ et leurs correspondants structuraux et fonctionnels chez les bactéries fixatrices de N₂ libres (TRIPLETT et SADOVSKY, 1992). Ils comportent des gènes structuraux de la nitrogénase dont *nifD*, *nifH*, *nifK*; *nifH* code pour la réductase alors que *nifD*, *nifK* le font pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (PLEMONT, 1995; CROSSMAN, 2004).

- **Gènes Fix**

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (BREWIN, 1992; HOPKINS, 2003). Les gènes *fixABCX* coderaient pour des protéines impliquées dans le transport des électrons vers la nitrogénase. Les gènes *fixGHIS* interviendraient dans le processus d'oxydo-réduction au sein du complexe membranaire. Les fonctions des gènes *fixKNR* ne sont pas encore connues (WERENER, 1992).

I.4.Mécanisme de la nodulation

La symbiose des BNL joue un rôle important en agriculture à cause de sa capacité de fixer l'azote atmosphérique en n'utilisant que l'énergie fournie par la photosynthèse.(BENREBAH, 2001).

I.4. 1. Formation des bactéroïdes

L'envahissement des bactéries dans des cellules de la plante hôte est débuté par la formation d'une gouttelette d'infection. Les gouttelettes d'infection peuvent former au bout des fils intracellulaires courts d'infection . Les bactéroïdes mûrs de membrane de cellules de la plante continuent à accumuler de grandes quantités de PHB ou polyhydroxybutyrate (JUERGEN PRELL et COL, 2006).

I.4.2.Les étapes de la nodulation

Il comporte les étapes suivants (fig1. 2)

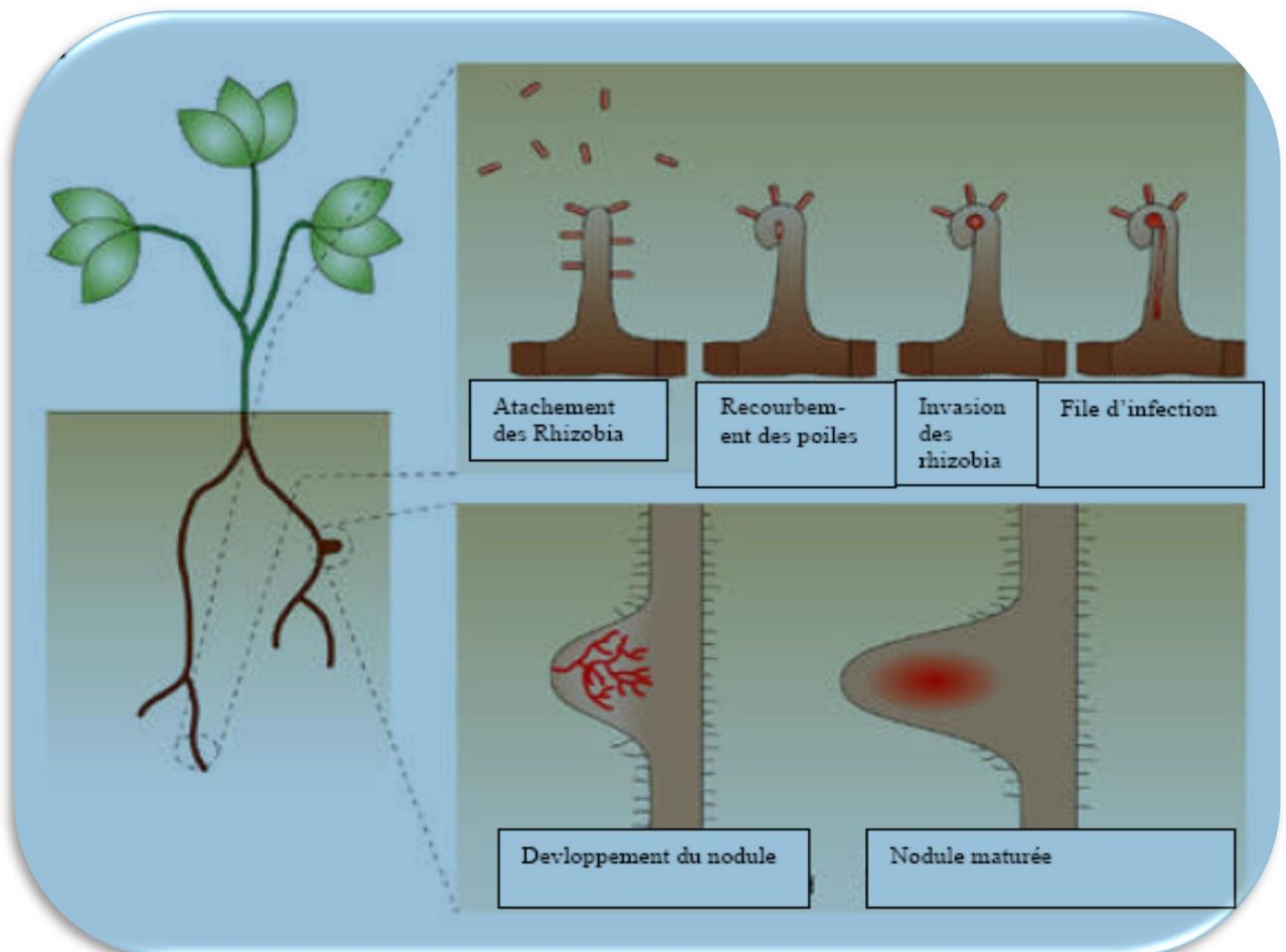


Figure1. 2 : Processus de la nodulation (GILES et *al.*, 2004)

- **pré-infection**

Les *rhizobia* vivent librement dans le sol, mais ils sont difficiles à les déceler car ils ne présentent pas des propriétés biologiques particulières. Dans le sol, les racines de légumineuses sécrètent des substances de la famille des flavonoïdes qui attirent les bactéries.

Celle-ci migrent vers l'extrémité des poils absorbant, s'y fixent, et libèrent à leur tour des hormones (acide gibbérellique indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire, provoquent la courbure du poil. En réponse, le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi, la pénétration des bactéries est facilitée (DUPUY et NOUGIER, 2005).

- **Infection**

L'infection est la pénétration des *Rhizobia* en différents points du système racinaire. Il se forme dans les poils absorbants, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux. Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (HOPKINS, 1999).

- **Développement de nodule**

Les étapes qui suivent, sont la croissance du cordon d'infection contenant les cellules de rhizobia vers le péricycle de la racine, se développant en primordium nodulaire, la ramification du cordon permet d'infecter un plus grand nombre de cellules primodium et la libération des bactéries dans le cytoplasme des cellules végétales, la différenciation des bactéries en bactéroïdes, couplées avec la synthèse de la leghémoglobine et du complexe enzymatique nécessaire à la fixation se produit après. Les nodosités efficaces sont caractérisées par la présence de la leghémoglobine à l'intérieure (BROUGHTON, 1984).

- **Phase de dégénérescence**

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol (RICHTER, 1993).

II . Les légumineuses

Les légumineuses constituent une immense famille dont le seul caractère commun est de produire un ovaire libre, constitué par seul carpelle qui donne un fruit appelé gosse ou légume .

Les légumineuses sont des angiospermes cosmopolites, arbrescentes ou fabacées, très diversement constitués, mais presque toujours à feuilles pennées, alternés et stipulés. Les fleurs sont habituellement en grappes (COME et *al.*, 2006).

Beaucoup d'espèces sont cultivés pour leurs graines qui sont riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines (Fenugrec, Lupin, Soja) les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotie servent a l'alimentation du bétail. (COME et *al.*, 2006). le composition de réserve est résumé dans le tableau suivant:

Tableau1. 1 : Composition des réserves de quelques gaines d'espèces cultivées (LAZREK BEN FRIHA, 2008).

Céréales	Compositions moyenne en %		
	Protéines (amidon)	Huiles	Carbohydrates
Orge	12	3	76
Maise	10	5	80
Avion	13	8	66
Seigle	12	2	76
Blé	12	2	75
Légumineuse			
Haricote	23	1	56
Petit pois	25	6	52
Arachide	31	48	12
Soja	37	17	26

II.1.Intérêts 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. Ces plantes sont capables de s'adapter à des sols très pauvres, et très dégradés.

Ces plantes ont donc un rôle améliorateur de sol, en plus d'un intérêt alimentaire. L'intérêt alimentaire est évident : cette famille représente le 2^{ème} rang mondial (derrière les céréales), on peut citer le soja, les lentilles, les haricots et autres fèves (SEIHI, 2008).

1. Mimosideae

Cette sous-famille comprend plus 65genre et 2900 espèces, que l'on trouve surtout en régions tropical (NEYRA, 1992) .Il sont caractérisées par des fleurs actinomorphes et corolle à préfoliation valvaire; ovules anatropes ; étamines libres et en nombre variable avec graine albuminées. (BOUMLIK, 1995).

2.Caesalpinioideae

La sous-famille des *caesalpinioideae* comprend environ 150genre et 22000 espèces , rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en région tropical et subtropicales (BESINI, 2010). Ce sont des légumineuse à fleur zygomorphe et corolle à préfoliaison carénale . Les ovules sont anatropes et l'embryon droit, la graine est albuminée (BOUMLIK, 1995).

3. Papilionoideae ou Faboideae

Elle représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces. Ces sont principalement des herbes et des petits arbustes distribués dans le monde entier, présentes en régions tempérées et tropicales (SEBIHI, 2008).

Le feuilles stipulées de type imparipenné peuvent se réduire au type trifolié . La foliole terminal peut être remplacées par une vrill ou disparaître donnant un type bifolié (NEYRA, 1992).

II.3. Le genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* est l'un des plus importants genres de la famille légumineuses, il est représenté dans le monde par près de deux milles espèces localisées dans l'hémisphère Nord du globe terrestre. Dans les pays du bassin Méditerranéen, cinquante espèces ont été décrites dont ciquantaine en Afrique du Nord, au Sahara Algéro-Marocain, une quenzaine d'espèces ont été identifiées (BEN AROUS, 2006). Leur classification est comme suit:

Embranchement: Cormophytes

Classe : Dicotylédons

Ordre: Rosales

Famille : Fabacée

Genre : Astragalus

Ce genre a trois synonymes; *Acacia armata* (Willd.) Batt , *Acanthyllis tragacanthoides* (Desf.) Pomel et *Anthyllis tragacanthoides* Desf (SAUDI, 2008).

▪ **Espèce *Astragalus armatus***

Les caractéristique de cette plant sont:

Genre: *Astragalus*

Espèce: *armatus*

Nom vernaculaire: *Gondole / Kded*

Nom francais: *Astragalus vulnérent*

Description :

Arbrisseau très épineux et très coriace à épines blanchâtres de 80 cm de hauteur rameaux écailleux(CHAHMA, 2006). Il a une gousse uniloculaire non divisé longitudinalement par une cloison, à parois parcheminées; calice renflés en vésicule, enfermant le fruit. C'est une plante très épineuse, les pétioles devenant, durs et aigüs, folioles petite très caduques, rameaux écailleux,et glabres (OZENDA, 2004). (fig1. 5)



Figure1. 4: *Astragalus armatus*

Habitat:

Rencontrée en colonies dans la limite nord du Sahara septentrional.

Répartition:

Lisière nord du Sahara, en bordure des hautes plateaux.

Période de végétation:

Floraison en janvier – février .

Intérêt pastorale:

C'est une plante appréciée et broutée en grandes quantités par les dromadaires. (**Chahma, 2006**).

II.4. Intérêt médical du Genre

L'Astragale est native du Nord de la Chine. Les parties de la plante utilisées sont les racines cueillies au printemps et séchées pendant 4 ou 7 ans. Cette la plante a été la plus étudiée et soumise à des recherches intenses en botanique comme en pharmacologie.

L'Astragale contient de nombreux éléments actifs, tels que des flavonoïdes, des polysaccharides, des glycosides triterpènes (de type astragalosides I-VII), des acides aminés et des traces de minéraux. Les différentes recherches sur l'Astragale démontrent que :

- Est utilisé avec d'autres produits d'herboristerie pour traiter la baisse d'immunité cellulaire qui suit la chimiothérapie contre le cancer.
- Est considéré comme un tonique du yang, et beaucoup de plantes de ce groupe semblent avoir un effet bénéfique sur le système immunitaire. (Le yang est une fonction vitale selon la médecine traditionnelle chinoise).
- L'astragale, employé dans le traitement de l'hépatite B et d'autres infections virales, fut l'une des premières plantes reconnues comme pouvant être utiles dans le traitement du VIH.
- l'Astragale contient également un flavonoïde nommé astragaline, qui est un puissant antioxydant

III. Le microsymbiont (BNL)

Les microorganismes peuvent former des associations intimes soit à l'intérieur de tissu racinaire, à la surface des racines, ou bien dans le sol collé immédiatement sur les racines (BENAGGAB, 2001).

III.1. Bactéries Nodulant les Légumineuses

Les bactéries qui établissent une symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses, sont appelées collectivement *Rhizobium* (RAVEN et al., 2000). Maintenant, ils sont connus par les BNL.

La famille de *Rhizobiacées* sont constituée par un ensemble hétérogène des bactéries en bâtonnets Gram- négative, non sporulant, qui peuvent infecter les racines et, parfois, les tiges de légumineuse pour y former des nodules (structure aussi désignées sous le terme de nodosités) (DOMMERGUES et al., 1999).

III.2. La taxonomie bactérienne

La taxonomie étudie les relations qui existent entre les organismes ; elle englobe la classification, la nomenclature et l'identification. Antérieurement basée sur des similarités de fonction (diazotrophes, phototrophes, nodulation), L'histoire de classification des *Rhizobia* commence au XIX^{ème} siècle, quand BEIJENCK (1888) et FRANK (1889) regroupent toutes les bactéries isolées de nodosités des racines de légumineuses dans le genre *Rhizobium*. Il sont différenciées de souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium*. Plus tard, le genre *Rhizobium* sera subdivisé en 3 genres: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*. La classification des *Rhizobia* évolue chaque année, regroupant les BNL. (Ou Bactéries Nodulant les Légumineuses) préférant au terme de *Rhizobia* (Tableau 2)

Tableau1. 2: Classification de *Rhizobia* (BERRADAet FIKRI-BENBRAHIM, 2014).

Genus species	Isolation source
<i>Class: Alphaproteobacteria</i>	
<i>Order: Rhizobiales</i>	
<i>Family: Rhizobiaceae</i>	
<i>Genus: Rhizobium</i>	
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>symbiovar viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i>
<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</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 benjamina</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. cellulosityticum</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: <i>Ensifer</i>	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine</i>
<i>symbiovar siensis</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Different host plants</i>
<i>E. terangae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Sesbania</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>norhizobium xingianense</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>Acacia angustissima</i>

<i>E.numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>
Genus: <i>Shinella</i>	
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
Family: <i>Phyllobacteriaceae</i>	
Genus: <i>Mesorhizobium</i>	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Prosopis,</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. thiogangeticum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. albiziae</i>	<i>*Albzia kalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>
<i>M. gobiense</i>	<i>Wild legumes</i>
<i>M. tarimense</i>	<i>Wild legumes</i>
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>

<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>
<i>M. abyssinicaeummerowiae</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>
<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. hawassense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>M. shonense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana species</i>
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus species</i>
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>
Genus: <i>Phyllobacterium</i>	
<i>P. trifolii</i>	
Family: <i>Methylobacteriaceae</i>	
Genus: <i>Methylobacterium</i>	
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>
Genus: <i>Microvirga</i>	
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus sp.</i>
<i>M. lotononidis</i>	<i>Different legume host</i>
<i>M. zambiensis</i>	<i>Different legume host</i>
Family: <i>Brucellaceae</i>	
Genus: <i>Ochrobactrum</i>	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i>
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>
Family: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	

Genus: Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>
<i>A. oxalatophilum</i>	
Genus: Devosia	
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>
Family: Bradyrhizobiaceae	
Genus: Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae et Loteae</i>
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
Class: Beta Proeobacteria	

Order: Burkholderiales	
Family: Burkholderiaceae	
Genus: Burkholderia	
<i>B. caribensis</i>	<i>Vertisol microaggregates</i>
<i>B. cepacia B.</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa Mimosa spp.</i>
<i>B. rhizoxinica B.</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp.</i>
<i>B. endofungorum B.</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. helea B.</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp.</i>
Genus: Cupriavidus	<i>Aspalatus carnosa</i>
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa sp</i>
Class: Gamma -Proteobacteria	
Order: Pseudomonadales	
Family: Pseudomonaceae	
<i>Pseuomonas. sp.</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>

* espèce sans des capacités décrites de nodulation incluses dans des genres rhizobial traditionnellement

IV. Biodiversité des rhizobia

Les rhizobiums sont connus comme des bactéries fixatrices d'azote ayant la capacité d'établir des relations symbiotiques avec plusieurs espèces de la famille des fabacées. Toutefois, une large population de *Rhizobia* non symbiotiques peut exister dans le sol ou dans la rhizosphère des plantes légumineuses. Ils peuvent également exister comme des cellules viables dans l'eau où ils sont capables d'infecter et de noduler des légumineuses aquatiques telles que *Aechynomene* spp. et *Sesbania* spp (El-HILALI, 2006).

IV.1.Méthodes d'étude de la diversité

Plusieurs techniques ont été utilisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des rhizobia. Ces techniques ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce.

IV. 1. 1 . Les marqueurs phénotypiques

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (GRAHAM *et al.*, 1991).

Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme).

Les critères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée.

Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différents enzymes .Les critères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie sur le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar), la capacité d'utiliser différents carbohydrates et différentes sources d'acides aminés comme seule source de nitrogène, la croissance à différentes températures, la tolérance aux variations du pH et à différentes concentrations en sels, la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (VINCENT, 1970).

IV.1.2. Les marqueurs moléculaires

Ces marqueurs regroupent différentes techniques utilisant les acides nucléiques ADN ou ARN pour étudier la localisation ou la variabilité en séquence des gènes ou de fragments de gènes. Les techniques les plus utilisées chez les rhizobiums sont les suivantes

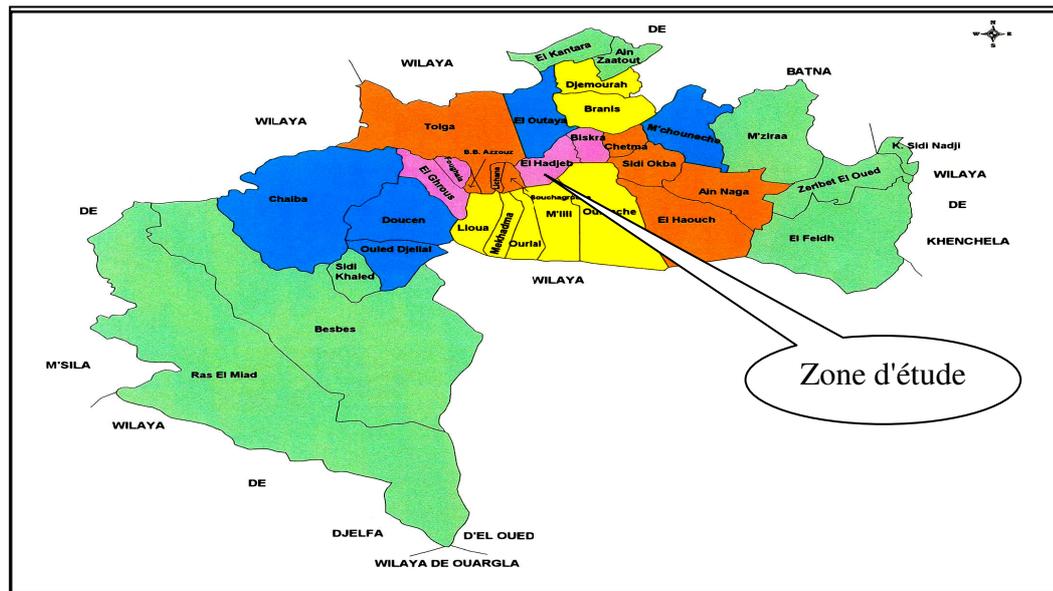
- a) Détermination du pourcentage Guanine + Cytosine (% G + C).
- b) L'hybridation ADN 1ADN.
- c) Le séquençage de l'ADNr 16S et d'autres gènes.
- d) Les méthodes de typage basées sur la PCR (ZAKHIA, 2004).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

I. Isolement des bactéries nodulant *Astragalus armatus*

Les nodules sont été obtenus associé avec les racines d'*Astragalus armatus* trouvés dans plusieurs régions de Sud-Est Algérien différentes sur les conditions climatique et pédologique. Un échantillon collecté à partir de la région de El-Hadjeb wilaya de Biskra, Algérie.



Carte 1. 1 : Localisation géographique des zones de prélèvement (WWW.GOOGLE.DZ/ DIPMI-BISKRA.COM).

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 quant la terre est sec, à cette période de l'année les nodules sont bien développée et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée suivant la méthode de VINCENT(1970) ; BECK et *al.*,(1993). Une creusée d'environ 15 cm au tour de la plante et 20 cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.(fig2. 5)



Figure 2.5: Collecte des nodules *Astragalus armatus*

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau de robinet puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachées à 1 à 2 mm du site d'attache, en fin séchées avec du papier filtre avant leur conservation (Fig2.6).

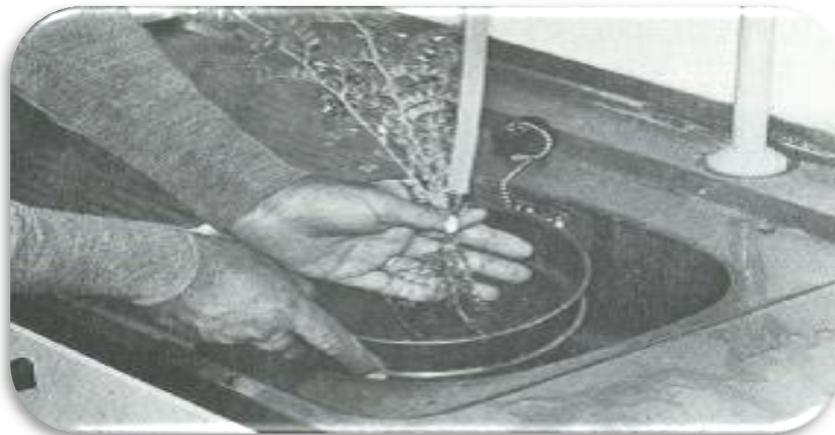


Figure 2. 6: Rinçage des racines et nodules (Photo D.P. BECK, 1993)

I.2. Conservation des nodules

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

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par VINCENT (1970) et SOMASEGRAN 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 (fig 2. 7).

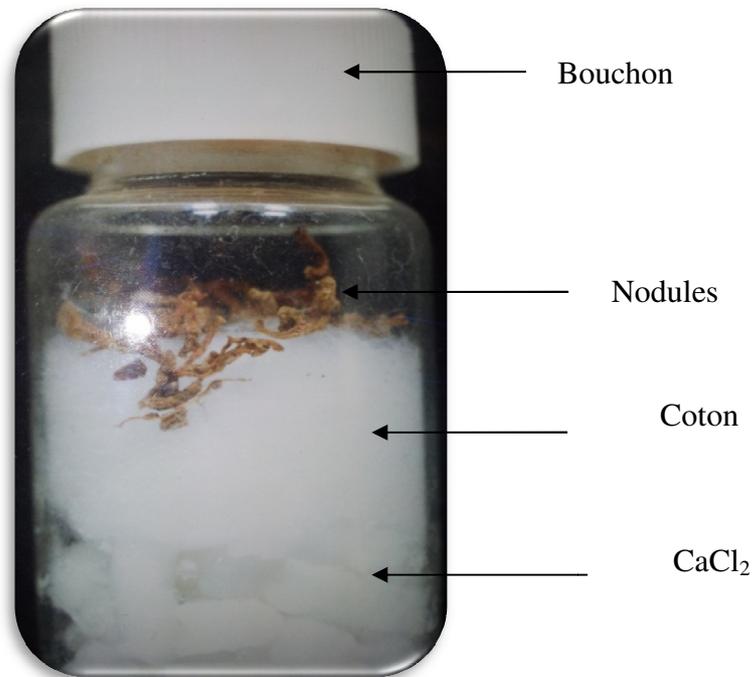


Figure 2.7 : Conservation des nodules sous CaCl_2

I.3. Isolement des souches à partir des nodules

La technique d'isolement des bactéries est celle décrite par VINCENT (1970) et SOMASEGRAN et HOBEN (1994). Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles qui sont conservées par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C , puis pendant 1 h à la température ambiante.

I.3.1. Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans l'eau de javelle pendant 3 minutes. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10^{ème} rinçage (fig 2.8).



Figure2. 8: Stérilisation de nodules

I.3.2. Ecrasement des nodules

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile .puis déposées chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen (fig2.9).



Figure 2.9 : Ecrasement des nodules

I.3.3. Isolement des souches

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrans (VINCENT, 1970). (Fig2. 10)

Sur gélose coulé en boîte (YMA+RC et GPA+ BcP, et YMA+ BTB), puis incuber à 28°C pendant 48 à 72 heures.

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

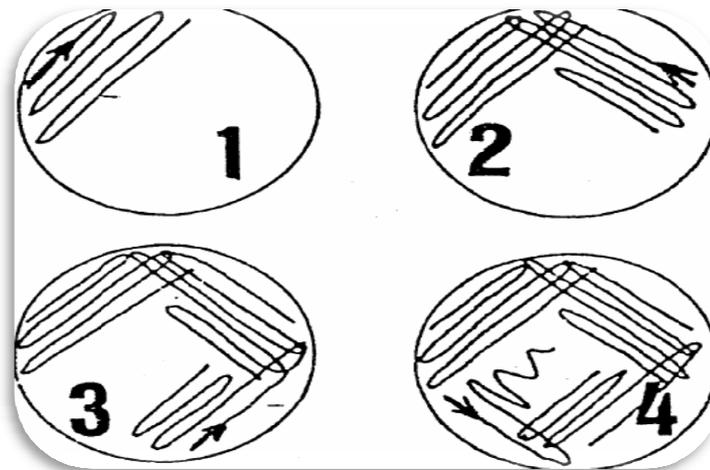


Figure 2.10: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (VINCENT, 1970)

II. Caractères cultureux

II.1. Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (Annexe 1)

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

- Milieu liquid: YMB (Yeast Manitol Broth)
- Milieu solid: YMA (Yeast Manitol Agar)
 - YMA + RC (Yeast Manitol Agar)
 - YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Blue)
 - GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)
- L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.
- Incubées les boites à 28°C pendant 24heures.

II-2- Purification des isolats

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

La méthode consiste à ensemercer des tubes contenant le TY (fig 2. 11), puis les placer dans un vortex pendant 30 secondes et placé dans l'étuve à 28°C pendant 24heurs. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC.



Figure 2.11: milieu de TY

II.3. Examens microscopiques (Coloration de Gram)

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

II. 4. Examen de manitol mobilité

Par une anse de platine contient une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité (Annexe1). Incubé pendant 24h et observé. Confirment que les souches isolées sont mobiles avec une acidification du milieu et production importante du gaz.

II.5. Conservation des souches

Avant de conserver les souches elles sont ensemençées dans des tubes contenant 9ml de bouillon TY dans le but d'enrichir la culture pendant 24h à une température de 28°C. Le choix d'un procédé assurant la parfaite stabilité des microorganismes et leur survie prolongée dépend :

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

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

La première est la conservation sur YMA additionné de 1 à 3g/l de CaCO_3 comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés (fig2.12). Après l'ensemencement des tubes avec des culture bactérienne en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 28°C pendant 3 jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (VICENT ,1970).



Figure2.12 : Conservation des souches

III. Caractérisation phénotypique des isolats

III.1. Test nutritionnel

III.1.1.Utilisation des sucres comme seul source de carbone

Ces tests sont été mis en œuvre sur milieu YMB où l'extrait de levure à été réduit à 0.05g/l et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Glucose, Galactose, Maltose, Fructose et Saccharose (VINCENT, 1970). (Annexe 3)

On ensemence les différents milieux et on incube à 28°C dans incubateur pendant 24h, puis mesurer la densité optique (DO) à longueur d'onde 600 nm.

III.2. Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)

III.2.1. Réduction des nitrates

Les souches sont cultivées sur le bouillon TY contenant 0.1% de KNO_3 (p/v), et incubées pendant 4 jours à 28°C ; après incubation sont ajouté 3à4 goutte des réactifs nitrate

réductase I (Acide sulfanilique en solution dans l'acide éthanoïque (acétique)) et nitrate réductase II (l'alpha naphtylamine ou naphtylamine naphtyle-1-amine dans l'acide éthanoïque (acétique)).

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

III.2.2. Activité pectinolytique

Les souches sont cultivées à 30°C pendant 7 jours sur YMA où le mannitol est remplacé par l'inositol 0.1% et 0.2% de pectine. Après incubation les boites sont rincées délicatement avec l'eau courante puis avec une solution de rouge de Rithénium 0.05% pendant 30 minutes. Un halo clair autour des colonies indique la présence d'une Polygalacturonase.

III.2.3. Activité cellulolytique

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

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

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

III.3. Tests physiologiques (facteurs intrinsèque)

III.3.1. Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales, minimales et optimales de croissance les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubé à différentes températures: 4°C, 20°C, 28°C, 37°C.

III.3.2. 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. (Annexe 3)

IV .Résistance aux métaux lourds

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice en cultivant les différents isolats sur milieu TY contenant différentes concentrations de métaux lourds suivants : HgCl₂, ZnCl₂, Pb(CH₃COO)₂ de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 5000 µg/ml, et 8000 µg/ml. L'incubation se fait pendant 7 jours à 28°C. (Annexe 4).

Chapitre 3

Résultat et Discussion

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées . Elle constitue chez les rhizobia les mieux étudiés, la base de la description formelle de taxon, depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (VANDAMME *et al.*, 1996). En dehors de ces informations utiles et utilisables dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches efficaces, compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux.

I. Caractéristiques morphologiques et culturaux des isolats

Après, écrasement des 12 nodules récoltés à partir des racines d'*Astragalus armatus* d'Elhadjeb et ensemencement des boîtes contenant différents milieux des YMA, l'incubation seulement se fait pendant 5 à 7 jours ces 5 isolats en plus des souches de référence seront la base de nos tests, sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau3.3: Isolats et Souches de référence utilisées dans cette étude

Code de la souche	Nom de la souche	Plant hôte	Origine géographique	Source
A1	Isolat	<i>Armatus</i>	(Elhadjeb) Biskra Algérie	Notre étude
A2	Isolat	<i>Armatus</i>	(Elhadjeb) Biskra Algérie	Notre étude
A3	Isolat	<i>Armatus</i>	(Elhadjeb) Biskra Algérie	Note étude
A4	Isolat	<i>Armatus</i>	(Elhadjeb) Biskra Algérie	Notre étude
A5	Isolat	<i>Armatus</i>	(Elhadjeb) Biskra Algérie	Notre étude
A6	<i>Rhizobium sulla</i> sp.nov RHA6	<i>H.coronarium</i>	Constantine Algérie	A.Benguedouar- Cne
HCNT1	<i>R. sulae</i>	<i>H. capitatum</i>	Volterra, Italie	S. Casella- Pise

I.1. Croissance sur YMA

La croissance sur milieu YMA (Yeast Manitol Agar) est détectable après les colonies typiques sont abondants, circulaires, lisses, convexes, brillantes avec une texture translucide blanchâtres. Elles sont mucilagineuses (Fig3.13)

I.2. Croissance sur YMA + Rouge Congo

Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent peu le rouge Congo après 5jours à 28°C (Fig3.13 et Tab 3. 4). Ces résultats sont en accord avec ceux décrites par ABDULLAHI et *al.*, (2002) qui montrent que les souches isolées à partir de *Sesbania* peuvent absorbées le RC. C'est une caractéristique observée chez le genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (VINCENT, 1970).

I.3. Croissance sur GPA+BcP

Les colonies n'ayant pas acidifié le milieu GPA (pas de virage de Bcp au jaune). Selon **VINCENT, (1970)** sont prise en considération. Ces colonies propres aux bactéries nodulants les légumineuse (BNL). Les autres colonies acidifient rapidement le milieu GPA+BcP sont des contamination fortement colorées au jaune. (Fig 3.13 et Tab 3.4).

I.4.La vitesse de croissance

Sur le milieu YMA + bleu de bromothymol (BTB) : L'ensemble des isolats acidifie le milieu, on observe un virage de l'inducteur de pH au jaune après 24h à48h, ce qui indique que nos isolats appartenant à des bactéries à croissance rapide . Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes, par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (JORDAN, 1984). (Fig3. 13 et Tab 3.4).



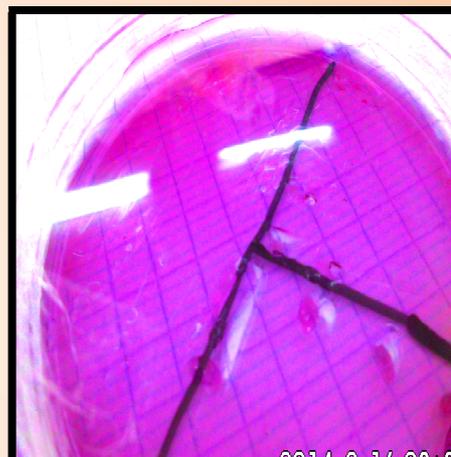
Croissance sur YMA



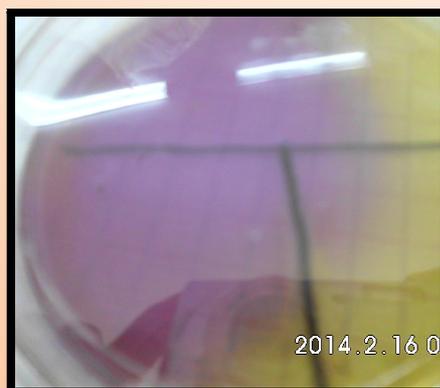
Croissance sur YMA+ RC



Croissance sur YMA + BTB



Croissance sur GPA+ BCP



Croissance sur GPA+BCP (acidification)

Figure 3.13: Caractère culturaux des souches isolées

Tableau 3.4: Caractères cultureux des souches nodulantes après 5 jours d'incubation à 28°C

Souches	Colonies sur milieu YMA+ RC	Réaction sur YMA+ BTB	Réaction sur GPA+BCP
A1	Légèrement rose, circulaire, mucilagineuse	Virage au jaune	Acidification
A2	Légèrement rose, circulaire, mucilagineuse	Virage au jaune	Acidification
A3	Légèrement rose, circulaire, mucilagineuse	Virage au jaune	Non acidification
A4	Légèrement rose, circulaire, mucilagineuse	Virage au jaune	Non acidification
A5	Légèrement rose, circulaire, mucilagineuse	Virage au jaune	Non acidification

I.5.Examen microscopique (Coloration de Gram)

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram est réalisée, qui va permettre de visualiser les bactéries au microscope optique. L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets roses Gram négatif. Ces résultats sont en concordance avec (ELINARINDRA, 2010) (Fig 3.14)

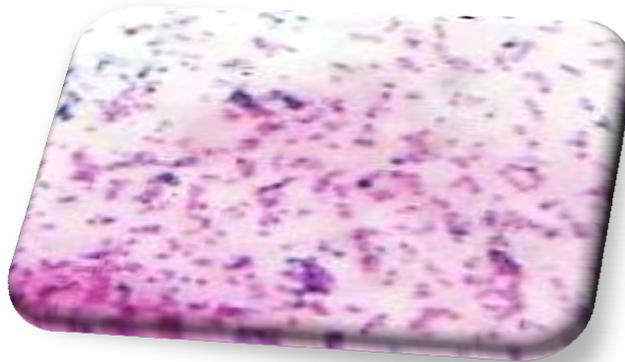


Figure 3.14: Coloration de Gram

I.6.Test de manitol mobilité

Aussi bien que l'ensemencement des isolats sur le milieu Mannitol mobilité confirme que les souches isolées sont mobiles avec une acidification du milieu et production importante du gaz apparaît ce qui indique les isolats fermentent le manitol. Ces résultats sont conformés à ceux de (Chabbi, 2010) (Figure3.15).



Figure 3.15: Résultat de manitol mobilité

II. Caractérisation phénotypique des bactéries

II.1. Test nutritionnel

II.1.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone

Après l'incubation, les résultats obtenus montre que les souches utilisent tous les sucres testé comme seul source de carbone mais avec une différenciation entre l'un et l'autre ainsi que les souches des référence.

Les mesures de la densité optique montre que les isolats A1 et A4 assimilent le glucose préférentiellement comme les souches des références HCNT1 . D'autre part nous avons signalé que les isolats A3 sont les plus similaire aux souches de référence A6 parce qu'elles utilisent tout les sucres avec une préférence au fructose . Le saccharose est le sucre le mieux assimilé en particulier par A1 et A2 . Tandis que le galactose est assimilé de préférence par A5. (Fig3.16) (Annexe 4).

Le genre *Rhizobium* se caractérise par la capacité de la majorité des souches à utiliser le mannitol, le glucose, le maltose , le fructose et le saccharose comme source de carbone (VINCENT, 1970 et WERNER, 1992).

Il a été montré par FALHCHIERI (1997) que la majorité des espèces à croissance rapide, et même lente, de la famille de *Rhizobiaceae*, peuvent utiliser une large variété de disaccharides préférentielle. A l'opposé, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (STOWERS,1985).

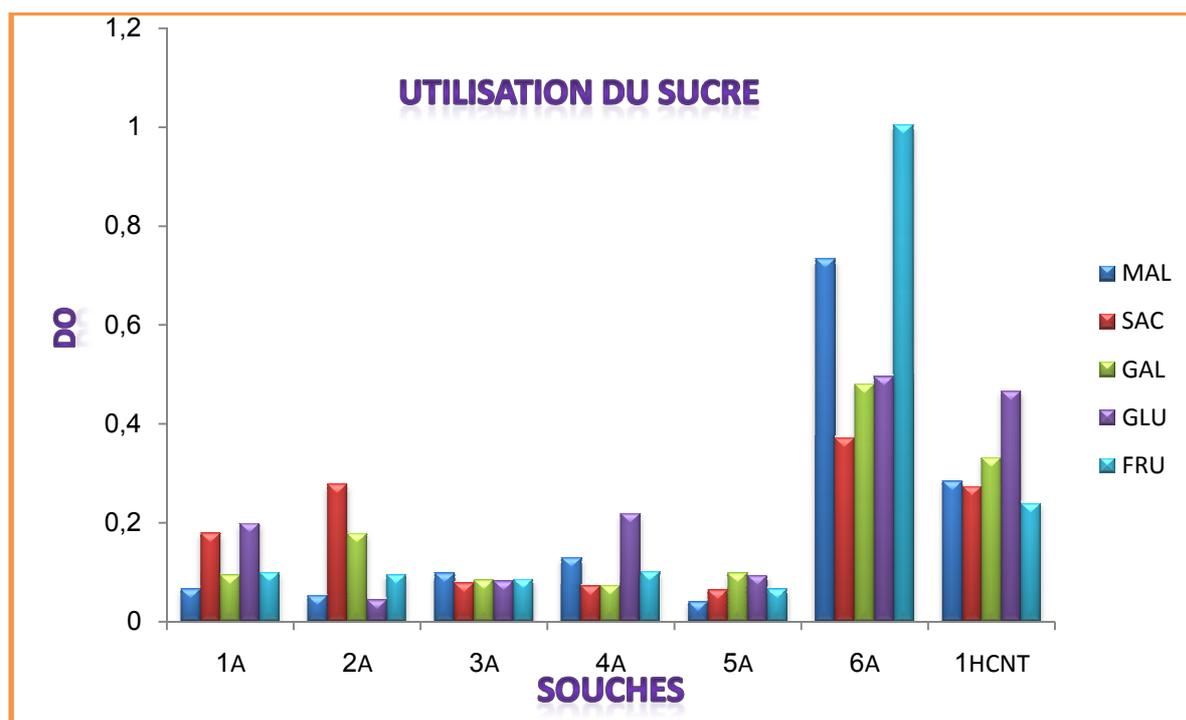


Figure 3.16: Utilisation des sucres par les souches isolé et les souches de référence

II.2. Test biochimique (recherche de certains enzymes)

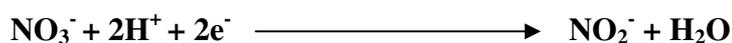
II. 2.1. Réduction des nitrates

Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs nitrates I et II toutes les souches A1, A2, A3, donnent une couleur rouge se qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites. Mai les souches A4 et A5 ne sont pas confirmé vue l'absence de la poudre de Zinc (Fig 3.17 et Tab3. 5). LINDSTROM et LEHTOMAKI (1988) ont trouvé que les souches de *R. meliloti* et *R. loti* possèdent l'enzyme de nitrate réductase par contre elle est absente dans les souches *R. leguminosarum*

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'une des importantes caractères taxonomiques (JOFFIN et *al.*, 2006).

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

La réduction des nitrates en nitrites utilisant une nitrate réductase suivant la relation :



la transformation des ions NO_3^- en ions NO_2^- ne peut s'effectuer que sous l'action d'une enzyme : la nitrate réductase qui est présente dans tous les organismes susceptibles de

métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi que quelques espèces de levures et bactéries (IDRISSI, 2006).



Figure3. 17: la réduction de nitrate

II.2.2. Activité pictinolytique

Après addition du rouge de ruthénium et rinçage avec de l'eau, un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive. Tous les isolats ont une enzyme qui hydrolyse la pectine et une activité polygalacturonasique (Fig3.18 et Tab3. 5).

Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par FAHREUS (1957) et STRUFFI et COL (1998), qui supposent que les bactéries du genre *Rhizobium* stimulent les plantes à produire des polygalacturonases qui dégradent la paroi cellulaire pour faciliter l'infection et la formation des nodules.



Figure 3. 18:Test pectinase positive (+)

II.2.3. Activité cellulolytique

Pour les souches de rhizobia, les colonies apparaissant sur un fond rouge entourés d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence l'activité cellulolytique, par contre pour les souches Gammaprotéobactéria, on remarque l'absence de l'halo et une activité cellulolytique négative (BENHIZIA, 2006).

Le même résultat négatif est noté pour nos isolats (Fig3.19 et Tab 5). Les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Astragalus* laissent apparaître une activité cellulolytique négative, mais les souches de référence doivent donner un résultat positif selon les études effectuées par plusieurs auteurs STRUFFI et al (1998), TORCHE (2006), et CHABI (2010) ; cela nous conduit à soupçonner les réactifs et les produits au niveau de laboratoire.

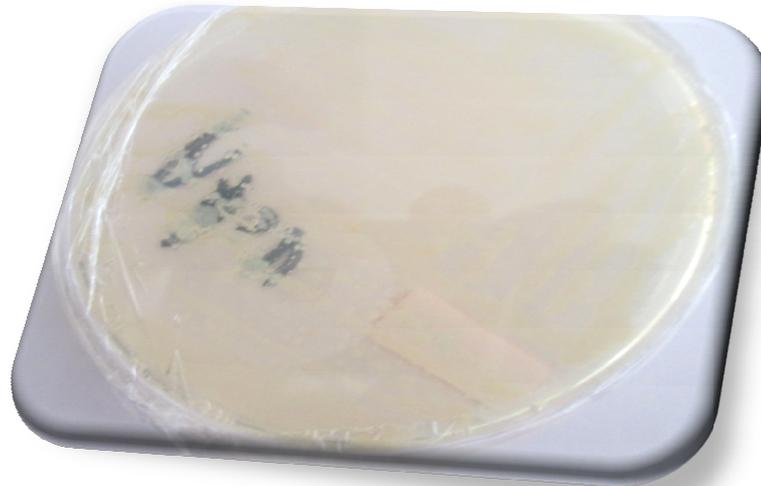


Figure3.19: Test cellulase négative (-)

Tableau 3.5: Les résultats des tests biochimiques

Souches	Réduction de nitrate	Activité pectinolytique	Activité cellulotique
A6	+	+	+
HCNT1	+	+	+
A1	+	+	-
A2	+	+	-
A3	+	+	-
A4	-/+	+	-
A5	-	+	-

N.B (+): résultat positive; (-/+) résultat soit négative (-) et soit positive (+), Le test reste à confirmer et compléter cause de l'absence de réactif confirmatif (poudre de zinc)

III.3. Test physiologiques

III.1. Température de croissance

La plupart des isolats sont capables de croître à une température de 4°C jusqu'à 37°C, et montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20°C à 28 °C. (Fig 3.20 et Tab 6). Ces résultats rejoignent ceux de MAATALLAH et *al.*, (2001) qui montre la température de croissance maximale du *Rhizobium de Cicer arietinum* est comprise entre 30 à 35°C.

Les rhizobia isolées par WEI et *al.*, (2003) peuvent également croître à 4°C , ainsi les souches isolées par BENHIZIA (2004) et TORCHE. (2006) résistent à des températures très élevées allant de 40°C à 44°C . RAZANEN et *al.*, (2002) déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries de survivre dans des périodes chaudes.

Tableau 3.6: Température de croissance testées

Code de la souches	4°C	20°C	28°C	37°C
A6	+(6j)	+	++	+
HCNT1	+(5j)	+	++	+
A1	±	+	++	+
A2	±	+	++	+
A3	+(5j)	+	++	+
A4	+(5j)	+	++	+
A5	+(5j)	+	++	+

N.B (++) : Croissance optimale; (+) : Croissance moyenne; (±) : Faible croissance; (-) : Inhibition de croissance; (+5j) : Croissance après 5 jours; (+6) : Croissance après 6 jours.

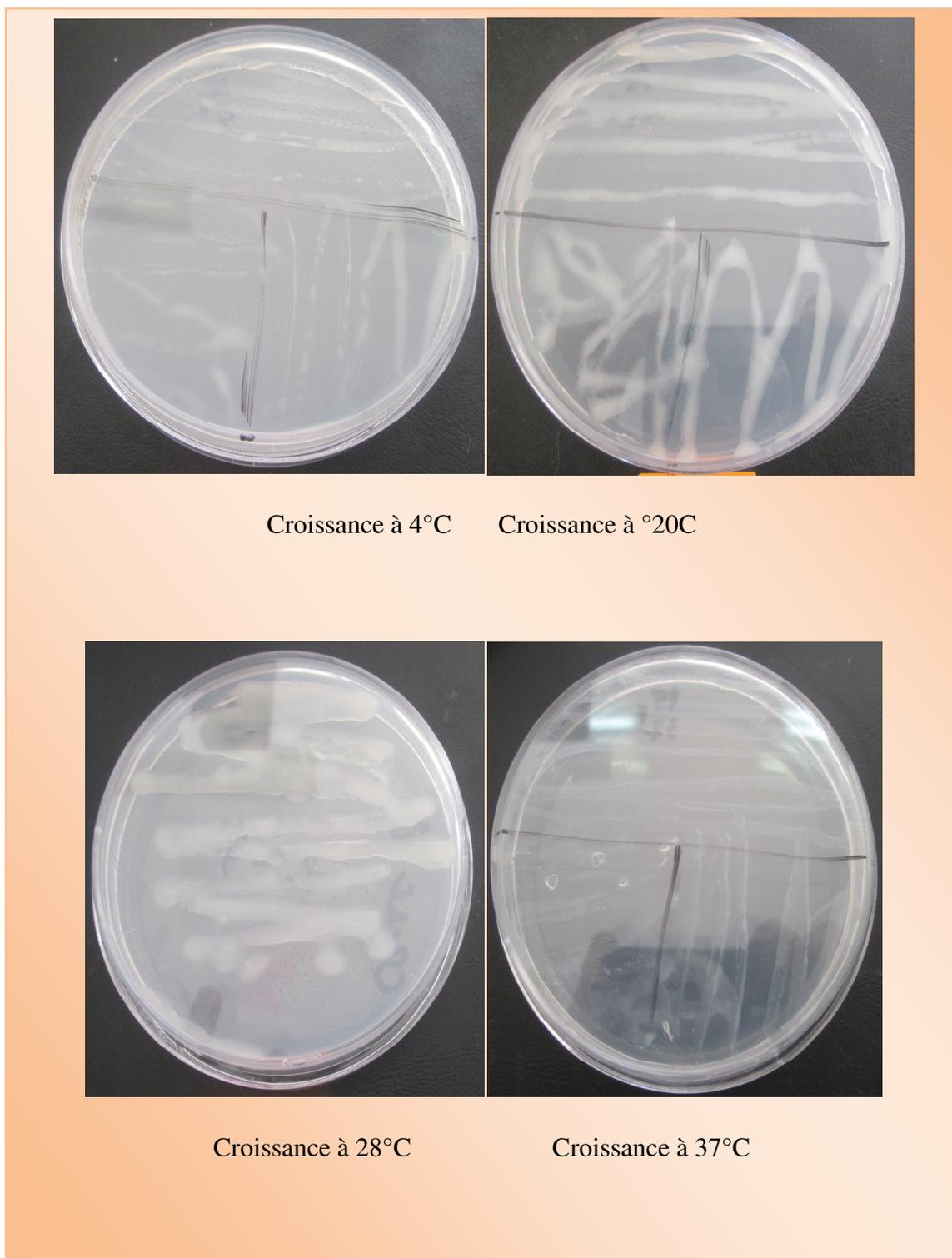


Figure3. 20: Effet des températures

III.2 Effet de pH:

En ce qui concerne la tolérance à l'acidité, tous nos isolats peuvent survivre à un pH de 5 à 8. Une faible croissance est observée à pH 8 chez toutes les souches.

A pH 5, on remarque une croissance moyenne chez les souches testées et même les souches de référence A6.

Le pH 6,8 représente le pH optimale des tous les isolats et aussi le souches de référence HCNT1 (Fig 3.21). (Annexe 4)

Donc le *Rhizobium d'Astragalus armatus* tolère l'acidité et l'alcalinité, ceci est en accord avec les résultats obtenus par GTARI et *al.*, (2003) qui montrent que les bactéries du genre *Frankia* sont capable de pousser du pH 5 à 8,5.

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

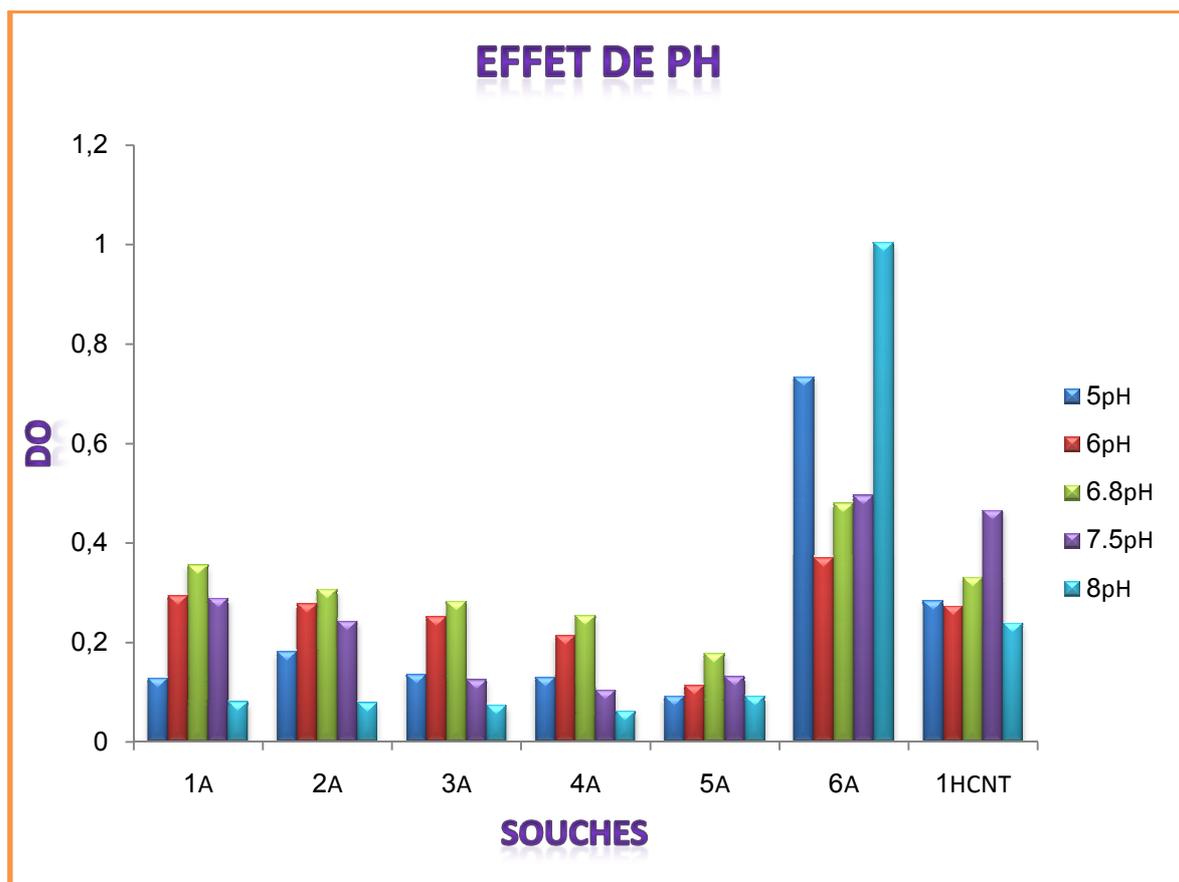


Figure 3.21: Effet du pH sur la croissance des souches isolé et les souches de référence

IV .Résistance aux métaux lourds

Après incubation des souches sur TY en présence des métaux lourds la première remarque à signaler est que toutes les souches tolèrent les métaux lourds à des concentrations différentes. (Tab 3.7).

La résistance à des concentrations plus élevées des Pb et Zn est observée dans toutes les souches, par contre la concentration minimale inhibitrice à partir de 5000 $\mu\text{g/ml}$.

Ainsi les souches font apparaître une sensibilité au HgCl_2 à une concentration variant entre 8000 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$.

STRUFFI *et al.*, (1998) ont montré que la résistance du *Rhizobium sllae* est variable au plomb et au cuivre, alors qu'elle présente une nette sensibilité au mercure.

Tableau 3.7: Résistance de souches aux métaux lourds en $\mu\text{g/ml}$.

Souches / Métaux lourds	A1	A2	A3	A4	A5
HgCl_2	1000	100	5000	1000	8000
ZnCl_2	8000	5000	5000	5000	8000
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	8000	8000	8000	5000	5000

- HgCl_2 : Chlorure de mercure; ZnCl_2 : Chlorure de zinc, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$: Acétate de plomb.

Conclusion

Conclusion

La reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia – légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

Nous avons procédé dans ce travail à un isolement et une caractérisation des bactéries nodulantes de la légumineuse fourragère *Astragalus armatus*, tout en suivant une démarche classique, celle appliquée par VINCENT (1970, 1982), SOMASGRAN et HOBEN (1994), relative à l'identification des bactéries appartenant aux genres *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Cette démarche se retrouve aussi dans les travaux de ZAKHIA et de LAJUDIE (2004) BENHIZIA et COL (2004), TORCHE (2006). A travers les résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques, les isolats se comportent pratiquement comme des rhizobia (morphologie des colonies sur **YMA**, vitesse de croissance **YMA+BTB** et le **GPA+BcP**, et présence des enzymes spécifiques au processus de nodulation ...).

A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées de la légumineuse *Astragalus armatus* ont le même aspect morphologique qui est détectable après 5 jours d'incubation dans les différents milieux de culture. Les différents résultats attribuent nos isolats à des bactéries à croissance rapide, et les colonies obtenues sont abondantes, circulaires, lisses, convexes, brillantes avec une texture translucide blanchâtres. Elles sont mucilagineuses que les souches de référence (souches appartenant au genre *Rhizobium*).

Les résultats des tests nutritionnels montrent que les souches peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates et n'exigent pas le mannitol comme seule source de carbone.

La recherche des enzymes spécifiques nécessaires pour la relation symbiotique démontre que les souches sont pourvues d'une nitrate réductase, et pectinase. On remarque que la cellulase est absente chez tous les souches.

Ainsi, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis des principaux facteurs de stress, en l'occurrence le pH et les températures.

Les souches sont capables de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 5 à 8. Quant à la température, la tolérance totale s'étend de 4°C à 37°C.

Nous avons apprécié le degré de l'inhibition de la croissance des souches par trois différents métaux sous formes de chlorure. L'inhibition s'est révélée plus importante selon l'ordre suivant $Hg > Zn > Pb(CH_3COO^-)_2$.

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

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

References bibliographiques

- ANONYME. 2005.** Un guide pratique de plantes médicinales *pour les personnes vivant avec le VIH* Éd, révisée. p 13.
- BECK D.P., MATERON L.A., AFANDI F., 1993 .** paractical *Rhizobium*- Légume. Technology Manual, ICARDA. Syria. P.290.
- BENAGGAB R. 2011.** Nutrition azotée sous déficience en phosphore chez le Niébé (*Vigna unguiculata*). Mémoire de Mggister, Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie El-Harrach-Alger, 166 p
- BENAROUS K.2006 .** Effets des extraits des quelques plantes médicinales locales sur les enzymes : Alpha amylase, Trypsine et lipase. Mémoire d'Ingénieur d' Etat en Biologie de l'Université Amar Telidji Laghouat, Algérie, 112 p.
- BENHIZIA Y.2006.** Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf. et *H. pallidum* DesfN . Thèse de Doctorat d'Etat en Microbiologie appliquée de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.
- BENSINIE. 2010.** Caractérisation physiologique et moléculaire d'une collection de rhizobiums nodulants quatre espèces du genre *Hedysarum* Len Algérie . Mémoire de Magister en Agronomie, Ecole National Supérieur Agronomique El-Harrche – Algérie ,111 pp
- Berrada H and Fikri-Benbrahim K . 2014.**Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives 1Laboratory of Microbial Biotechnology, Faculty of Sciences and Technology, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, P. O. Box 2202, Fez, Morocco. 4(6): 616-639
- BOUMLIK M. 1995.** Systematique de spermaphytes, Office de publique universitaire. Alger, p 53-55.
- BROUGHTON WJ. 1984.** Nitrogen fixation : Legumes. The journal of Chartto and Winds 2Td Indress.117.
- CHABI 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, 111 p.
- COM D., FRANCOISE C. 2006 .**Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes. Edition Tec et Doc. Lavoisier.
- CROSSMAN L C. 2004 .** Plasmid replicons of *Rhizobium*. Biochemical Society Transactions Vol 33, part 1.p .157-158.

- DOLY J J. 1998.** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science*, 3 (12): 473-478.
- DOMMERGUESY., DUHOUX E., DIEM H G. 1999 .** Les arbres fixateurs d'azote: caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Ed 34 (CIRAD, FAO, IRD).
- DUHOX E., NECOLE M. 2004 .** Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Ed, Dunod. Paris. France. pp 9-12
- DUPONT F. ,GUIGNARD J L. 2004 .** Botanique : systématique moléculaire. 13^{ème} édition. Elsevier Masson. Paris. France, pp : 155-160.
- DUPUX Y., NOUGIER P. 2005.** Les micro-organismes du gène à la biosphère Ed, ellipses France.
- EI HILALI I. 2006 .** La symbiose *Rhizobium*-Lupin : Biodiversité des Microsymiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse Doctorat ,Université Mohammed V-Adgal, Rebat, Maroc, 206 p.
- FAHREUS A. 1957.** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J.Gen.Microbiol.* 16 pp 354-381.
- FATMA LAZRAK BEN FRIHA. 2008.** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Tèse de doctorat de l'université de Toulouse, 255p.
- GERROUJE K., HANANE B ., MOHAMED O ., HANAA A., ROGER P et MESTAPHA M I. 2009.** Diversité des *Rhizobia* qui nodulent quelques légumineuse de la région oriental du Maroc, p 376.
- Giles E.D., Oldroyd., Dawnin, J.A., 2004 :** Calcium, Kinas and nodulation signaling in legume. Edition Nature Reviews Molecular Cell Biology. 5 : 566-576.
- GRAHAM P H. 1964.** Studies on the utilization of carbo-hydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek*. pp 68-72.
- GRAHAM P. H., M J. SADWSKY H ., KERTERSr., Y M BANET., R S BRADLEY., J E CPPPER., LEY D J., JARVIS B D W., E B Roslycky., B W STRIJDOM., and YOUNG J P W. 1991.** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp 582-587.

- GUIGNARD J.L, DUPONT F. 2007** . Botanique : systématique moléculaire. 14^{ème} édition, Elsevier Masson. Paris. France pp 155.
- HELLER R., ESNART R., LANCE C. 1998**. Physiologie végétale. 6^{ème} édition, Dunod, Paris,P 331
- HOPKINS W G. 1999** .Introduction to plant physiology, Second Ed , John Wiley andsons. Inc.
- HOPKINS W G. 2003** : Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. pp : 99-112.
- JEAN-MICHEL G ., MICHEL A ., WILLY M. 2010**. Le sole vivant 3^{ème} édition, Presses polytechniques et universitaire romandes. Italie. pp 701-702.
- JOFFIN J N., LEYVAL G. 2006**. Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4^{ème} édition de Scérén CRDP, Aquitaine,Espagne.
- JORDAN DC. 1984**. Rhizobiaceae. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp234-242.
- JUERGEN P and PHILIP P.2006** .Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. School of Biological Sciences, University of Reading, UK, RG6 6AJ.
- LYNCH J M., and WIPPS J M. 1990**. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant & Soil*. pp1-10.
- MAÂTALLAH J., BERRAHO E ., Juan S., Carmen L.2001**. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils *Agronomie* 22 .321–329.
- MADIGAN M., MARTINK J. 2007** . Brock Biologie des microorganismes 11^{ème} édition, Person Education ,France. pp 599-601, 676-681
- MEYER S., REEB C., BOSDEVEIX R. 2004**. Botanique: Biologie et physiologie végétales. Edition, Maloine, Paris ,France pp 216-219.
- MICHEL B . 2010**. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edition, Lavasoire,Paris. pp 598- 610.
- MOUAFEK A. 2010**. La symbiose à rhizobiza chez la fève (*Vicia fabal* L) et la luzerne (*Medicago Sativa* L) dans la région de Biskra . Mémoire de l'université Mohamed Khider de Biskra , Algérie .pp 6- 16.
- MOULIN L. 2002** .Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène nodA à l'identification de rhizobia au sein des bêta-Protéobactéries.

Thèse de doctorat des sciences biologie. Université Claude Laude Bernard-Lyon I. France. pp.289.

MYLONA P., PAWLOWSKI K., BISSELING T. 1995 . Symbiot nitrogen fixation. *Plant Cell* 7 : 869-885.

NAYRA M. 1992. Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote : légumineuse / Rhizobium. Ed . FAO.

OZENDA P. 2004. Flore et végétation du Sahara 3^{ème} édition , CNRS,Paris.p 300.

PAWLOWSKI K., et BISSELING T. 1996. rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features *Plant Cell* 8 pp 1899-1913.

PELMONT J. 1995 . Bactérie et environnement adaptation physiologique. Ed? Office des Publications Universitaires. Vol 2.

PERRYe J J., STALEX J T., LORY S. 2004. Microbiologie cours et questions de revision. Edition, Dunod, Paris, France.pp 634- 636

QUZEL P et SANTA S. 1962 .Nouvelle flore de l'Algérie et des région désertiques méridionales. CNRS, Paris, France.

RAJAONARIMAMY E.2010. Influence de la diversite mycorhize sur la symbiose *Dalbrgia trichcarpa* – rhizobia et sur la structure de la microflore tellurique . Mémoire pour l'obtention d'etude approfondies en science de la vie, université Antananarivo,99 p.

RAVEN ., EVERT., EICHORN. 2007. Biologie végétale. 2e édition. boeck.,Paris France.pp 736-740.

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

RICHTER G. 1993 . Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Ed ,presse polytechniques et universitaires romandes. pp 341-352.

RICKLFS ., MILLER . 2005. Ecologie . Ed, Boek, Paris pp 214-216.

ROGER P. 1996 .La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement Conference debat de l'ORSTOM,Paris ,France.

SAOUDI M. 2008 . Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.L.) : caractérisation des bactéries associes aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*, Thèse de Magister, Université Mentouri Constantine. 99p.

SEBIHI F Z. 2008. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère,

Hedysarum perrauderianum, Thèse de Magister, Université Constantine, Algérie,121p.

SOMASEGRAN P., HOBEN H J. 1994 . Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .

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

STRUFFI P., CORICH V., GIACOMINI A., BENGUEDOUARE A., SQARTINI A., CASELLA S., NUTI M P. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology. 84(1) pp 81-89. supporting bacteria Current Science, Vol. 89, N°1.

TORCHE A. 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister de l'Université Mentouri Constantine, Algérie,166p.

TORTORA G J., FUNK B R., CASE C L. 2003. Introduction à la microbiologie, Ed, Renouveau Pédagogique Inc. pp : 826-830.

TRIPLETT E W and SADOVSKY M J. 1992 . Genetics of competition for nodulation of legumes, Ann Rev Microbiol **46** : 399-428.

VANDAMME P B., GRILLISrP D V., KERSTERS K ,SWINGJ..1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60 pp 407- 438.

VINCENT JM. 1970 .The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.

WEI G H., TAN Z Y., ZHU M E., WANG E T., HAN S Z., and CHEN W X. 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1575-1583.

WERNER D. 1992 . Symbiosis of plants and microbes, Ed, London : Chapman Hall.

ZAKHA F., JEDER H., DOMMERGUES O., WILLEMS A., CLEYETI-MAREL JC., GILLIS M., DREYFUS B., et DE LAJUDIE P.2004 . Characterisation of wild legume nodulating bacteria (BNL) in the infra-arid zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. **27(3)** : 380-395.

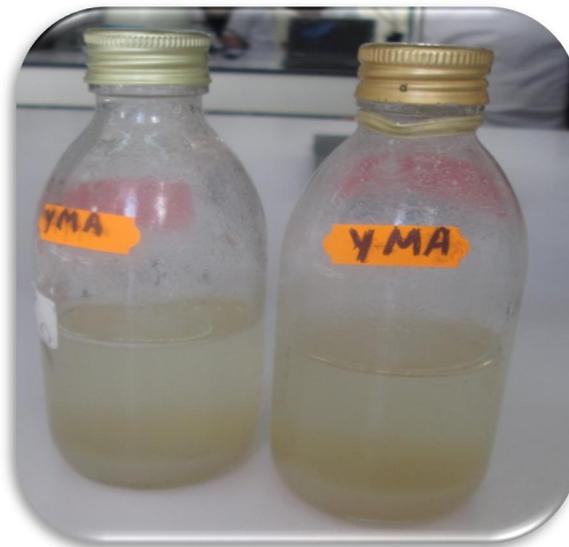
Annexes

Annexes – 1**Milieux de culture utilisés****▪ 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	1000ml
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

▪ Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

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



▪ **Milieu YMA + Rouge Congo en g/l(Vincent, 1970).**

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

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



▪ **Milieu YMA + bleu**

70).

YMB	
Solution stock de bleu de bro	
Agar	
pH	
Autoclavage	ndant 20minutes
Après ajustement de pH on a	0.5g BTB dans 100ml
d'éthanol), puis on ajoute l'a	



▪ **Milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + pourpre de bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).**

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

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



▪ **Milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l (Beringer, 1974)**

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



▪ **Milieu Manitol Mobi**

Caséine

Peptone

Nitrate de potassium

Manitol

Rouge de phenol

Agar

Eau distillé

pH

Autoclavage

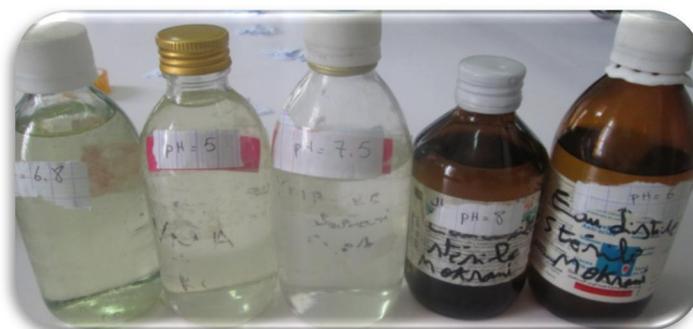
minutes



Annexes – 2**Coloration de Gram**

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

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

Annexes – 3**Test d'utilisation de sucre comme source d'azote****Test du pH****I**

Annexes – 4

Matériels utilisés



pH mètre

Spectrophotomètre

Etuve microbologique

Tableau: source de carbone (D.O.λ600)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	HCNT1
MAL	0.066	0.052	0.098	0.129	0.040	0.734	0.284
SAC	0.179	0.278	0.078	0.072	0.064	0.371	0.273
GAL	0.094	0.178	0.084	0.073	0.098	0.480	0.331
GLU	0.199	0.044	0.082	0.219	0.093	0.496	0.466
FRU	0.099	0.095	0.086	0.101	0.066	1.005	0.239

Tableau: Effet du p H (D.O.λ600)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	HCNT1
PH:5	0.128	0.182	0.136	0.130	0.092	0.340	0.230
PH:6	0.294	0.278	0.252	0.214	0.114	0.392	0.357
PH:6.8	0.356	0.307	0.283	0.254	0.178	0.845	0.790
PH:7.5	0.289	0.243	0.125	0.104	0.132	0.369	0.373
PH:8	0.081	0.079	0.074	0.062	0.092	0.341	0.314

Résumé

De douze souches isolées à partir des nodules de la légumineuse fourragère *Astragalus armatus*, seulement 5 souches sont sélectionnées, après un étude culturale.

Nos isolats sont caractérisés par des colonies blanches, lisse à croissance rapides, ils sont apparus sous forme des bacilles Gram négatif . La croissance des isolats sur les milieux sélectives classe ces rhizobia parmi le genre de *Rhizobium* à croissance rapide.

Les souches isolées sont caractérisé par une étude phénotypique (test nutritionnel, test biochimique, test physiologique et la résistance aux métaux lourds). Les souches utilisent des sucres comme seule source de carbone avec une grande gamme de différenciation entre l'un et l'autre. Les isolats possèdent enzyme nitrate réductase en enregistrant un activité pectinolytique positive et une activité cellulolytique négative . Les résultats des test physiologiques montrent que la température optimale est 28°C avec une tolérance à 37°C, le p H optimum est 6,8 .Une grande sensibilité est rearmé avec le chlorure de mercure et une variabilité pour le chlorure de zinc et l' acétate de plomb.

Les mots clé: Légumineuse, *Astragalus armatus*, Nodules, Rhizobium

Abstract

Twelve strains isolated from nodules of forage legume *Astragalus armatus*, 5 souches are selected only after a cultural study.

Our isolates are characterized by the white colonies, smooth to rapid growth, they appeared as Gram-negative bacilli. Growth of isolates on selective media class these rhizobia in the genus *Rhizobium* rapid growth

The isolated strains were characterized by phenotypic study (nutritional test, biochemical test, physiological test and resistance to heavy metals). Strains use pacifiers as sole carbon source with a wide range of differentiation between the one and the other. Isolates nitrate reductase enzyme have recording a positive pectinolytic activity and a negative cellulolytic activity. The physiological test results show that the optimum temperature is 28 ° C with a tolerance of 37 ° C, the p H optimum is 6.8. High sensitivity is reargue with mercuric chloride and a variability for the zinc chloride and acetate of lead.

Key words: legume, *Astragalus armatus*, nodules, Rhizobium.

ملخص

تم عزل 12 عينة بكتيرية من العقد الجذرية للبقوليات الرعوية *Astragalus armatus* بعد الدراسة الزراعية قمنا باختيار 5 عينات ، تظهر العزلات على شكل مستعمرات سلبية الغرام و نمو العينات في الأوساط المختارة صنف هذه الريزوبيا ضمن جنس الريزوبيوم ذات النمو السريع.

تميزت السلالات المعزولة من خاتل الدراسة المظهرية (اختبارات غذائية ،بيوكيميائية ،فيزيولوجية و مقاومة المعادن الثقيلة السلالات استعملت جميع السكريات المختبرة كمصدر للطاقة نلاحظ أن العزلات لها خاصية إرجاع النترات و تحتوي على إنزيم البكتين ولا تحتوي على أنزيم السيليلوز.

اضهرت نتائج الاختبارات الفيزيولوجية أن درجة الحرارة المثلى هي 28° و تنمو أيضا في درجة حرارة 37 ° ودرجة الحموضة المثلى هي 6.8 كما أن لها حساسية عالية من chlorure de mercure وتقاوم chlorure de zinc و acitate de plomb.

الكلمات المفتاحية: البقوليات, *Astragalus armatus*, عقد, ريزوبيوم.