

**République Algérienne Démocratique et populaire**  
**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abderrahmane MIRA Bejaia**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**

Mémoire pour l'obtention de Master en microbiologie  
**Spécialité: Ecologie Microbienne**

# Identification des bactéries nodulant les Viciae

Présenté par :

**M<sup>me</sup> LOUAILECHE Hanane**

Encadré par :

**M<sup>r</sup> BELHADI Djellali**

**Devant le Jury**

**Président : M. ADJEBLI Ahmed**

**Examineur : M. LADJOUZI Rachid**

**Co-promotrice : M<sup>lle</sup> BOUDEHOUCHE Wafa**

**Année Universitaire 2017/2018**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude, mon plus grand respect à Mr. BELHADI Djilali du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, pour m'avoir acceptée, suivie et encadrer tout au long de la réalisation de mon mémoire et de m'avoir fait confiance, tout au long de mon passage au laboratoire.

Je tiens à assurer mon plus grand respect à l'égard de ma co-promotrice Mlle BOUDDEHOUCHE Wafa qui ma suivie dans la réalisation pratique de ce travail. Je la remercie vivement pour ses nombreux conseils et sa sympathie légendaire.

J'adresse mes remerciements à mon mari Nadir qui m'a énormément aidé dans la réalisation de ce mémoire.

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire.*

- *A mon mari.*
- *A mes très chers parents.*
- *A ma belle mère*
- *A mes très chers frères et sœurs.*
- *A mes très chers beaux frères et belles sœurs.*
- *Aux filles de mes belles sœurs particulièrement Cylia et Lamia*
- *A ce qui a participé à la réalisation de mon mémoire.*
- *A mes amies.*

## *Liste des figures*

**Figure 1 :** Cycle de l'azote.

**Figure 2 :** Représentation schématique de la symbiose.

**Figure 3 :** Infection intracellulaire chez les Légumineuses.

**Figure 4 :** Types nodulaires chez les Légumineuses.

**Figure 5:**Phylogénie des légumineuses.

**Figure 6 :**Quelques espèces de vicia.

**Figure 7 :** Croissance sur YMA.

**Figure 8 :**Croissance sur YMA+BTB.

**Figure 9 :** Coloration de gram.

**Figure 10 :** Réduction de nitrate positif.

## *Liste des tableaux*

**Tableau N°1 :**La croissance des bactéries sur milieu YMA +BTB.

**Tableau N°2:**Les résultats de réduction de nitrate.

**Tableau N°3 :**Résultat de réaction de la catalase sur les souches étudiées.

**Tableau N°4 :** Résultats de test eau peptonée exempte d'indole.

**Tableau N°5:**Résultats du métabolisme des sucres par les isolats testés.

**Tableau N°6:**Effet de PH sur la croissance de souches testés.

**Tableau N°7 :**Effet de Na cl sur la croissance de souches testées.

**Tableau N°8 :**Effet de la température sur croissance des souches testées.

## *Liste des abréviations :*

**BNL** : Bactéries Nodulant les Légumineuses

**BTB** : Bleu de Bromothymol

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'Hydrogène

**KNO<sub>3</sub>** : Nitrate de potassium

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**PH** : Potentiel d'Hydrogène

**YMA** : Yeast Mannitol Agar

**YMB** : Yeast Mannitol Broth

**NO-3** : *Nitrate*

**NO-2** : *Nitrite*



# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Revue bibliographique .....</b>	<b>3</b>
I- L'azote.....	4
I-1 Le cycle de l'azote .....	4
I-2 Symbiose légumineuse-rhizobium.....	5
II- Les légumineuses .....	7
II-1 Généralités .....	7
II-2 Classification .....	7
II-2.1 Les Papilionoideae .....	8
II-2.2 Les Mimosoideae .....	8
II-2.3 Les Caesalpinoideae .....	8
II-3 Intérêt scientifiques des légumineuses en général .....	9
II-3-1 Intérêt agronomique des légumineuses .....	10
II-3-2 Intérêt alimentaire des légumineuses .....	10
III- Genre Vicia.....	10
III-1 Origine botanique .....	11
III-2 Description morphologique.....	11
III-3 Répartition géographique .....	12
III-3-1 Dans le monde.....	12
III-3-2 En Algérie .....	12
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes .....</b>	<b>13</b>
1- Caractérisation phénotypique des isolats .....	14
1-1 Caractères cultureux des isolats et examen microscopique.....	14
1-1-1 Croissance sur le milieu YMA.....	14
1-1-2 Test de BTB .....	14
1-1-3 Coloration de gram.....	14
1-2 Test biochimique .....	14
1-2-1 Réduction de nitrates .....	14

1-2-2	Catalase.....	15
1-2-3	L'eau peptonée exempte d'indole .....	15
1-3	test nutritionnel.....	15
1-3-1	Assimilation de la source de carbone .....	15
1-4	Test physiologique.....	15
1-4-1	Effet de pH.....	16
1-4-2	Tolérance au Nacl.....	16
1-4-3	Effet de la température.....	16
<b>Chapitre III</b>	<b>: Résultats et discussion .....</b>	<b>17</b>
1	Caractérisation phénotypique des isolats .....	17
1-1	Caractères cultureux des isolats et examen microscopique.....	17
1-1-1	Croissance sur le milieu YMA .....	17
1-1-2	Test de BTB.....	17
1-1-3	Coloration de gram .....	17
1-2	Test biochimique.....	
1-2-1	Réduction de nitrates.....	
1-2-2	Catalase .....	
1-2-3	L'eau peptonée exempte d'indole.....	
1-3	Test nutritionnel.....	
1-3-1	Assimilation de la source de carbone.....	
1-4	Test physiologique .....	
1-4-1	Effet de pH .....	
1-4-2	Tolérance au Nacl .....	
<b>1-4-3</b>	<b>Effet de la température .....</b>	
	<b>Conclusion .....</b>	
	<b>Référence bibliographique .....</b>	
	<b>Annexe.....</b>	

## ***Résumé***

Le Bassin Méditerranéen est le berceau de diversification d'un grand nombre d'espèces Végétales d'intérêt fourrager et alimentaire. Le genre *Vicia* est largement représenté au niveau du Bassin Méditerranéen, plusieurs espèces d'intérêt différent poussent dans différents milieux. Des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse fourragère et alimentaire *Vicia* sont caractérisés par une étude phénotypique (tests physiologiques, biochimiques et nutritionnels) qui donne une description comparable à celle des *Rhizobium*. Sur la base des caractères étudiés, les isolats portent les mêmes caractères phénotypiques des (BNL).

**Mots clés :** *Rhizobium*, *Vicia*, symbiose, phénotypique, caractérisation.

## ***Introduction***

Toutes les plantes ont besoin d'azote pour leur croissance; cependant, elles ne peuvent l'obtenir directement de l'atmosphère. Elles ne peuvent utiliser que de l'azote sous la forme liée d'ions nitrate ou ammonium qu'elles obtiennent soit du sol, soit par l'ajout d'engrais azoté aux sols agricoles (Zgadza et *al.*,2016).

La famille des légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales. Cette famille est importante sur le plan agricole, elle est spontanée ou cultivée dans le monde entier. Elle est utilisée à des fins diverses, notamment la production de nourriture et de fourrage, comme engrais verts ou (**Annexe 2**).

la protection du sol par la réduction de risques d'érosion (Chen et *al.*, 1995).

Selon les répartitions géographiques des plantes-hôtes et des micro symbiotes, la production d'inoculum rhizobial est nécessaire dans beaucoup de cas quand des légumineuses sont déplacées dans de nouveaux secteurs (Sullivan et *al.*, 1996). Vu la spécificité de la symbiose entre les rhizobia et leurs plantes hôtes, il est utile d'étudier cette relation et de l'adapter à certains environnements.

L'identification et la caractérisation des isolats locaux sont importantes pour explorer ces ressources microbiennes pour optimiser l'utilisation des légumineuses.

Le genre *vicia* représente par des plantes fleurissantes, contient 1400 espèces. Ce genre est réparti dans des régions climatiques méditerranéennes du Sud européen et, en Algérie se développe autour des montagnes de Kabylie, de la Mitidja, du Chélif et dans les hauts plateaux.

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

Pour cette raison et en tenant compte de l'importance des légumineuses dans la consommation animale et humaine, une certaine attention est donnée à l'écologie des B.N.L. (habitats, effet des facteurs extrinsèques et intrinsèques, nutrition, ...) (Ibekwe et *al.* 1995).

Dans l'objectif d'étudier les bactéries associées aux nodules des racines des espèces de légumineuses du genre *Vicia*, les isolats sont caractérisés par une étude phénotypique (aspects morpho-cultureux, tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels, et par une prestation symbiotique avec le partenaire, la plante-hôte).

Ce mémoire est structuré en trois chapitres:

Le premier traite les généralités sur la fixation symbiotique et les légumineuses.

Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes suivies pour sa réalisation.

Le troisième est consacré à la présentation des résultats et leurs discussions et enfin, nous terminerons par une conclusion et quelques perspectives.

# CHAPITRE 1

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



## **I- L'azote**

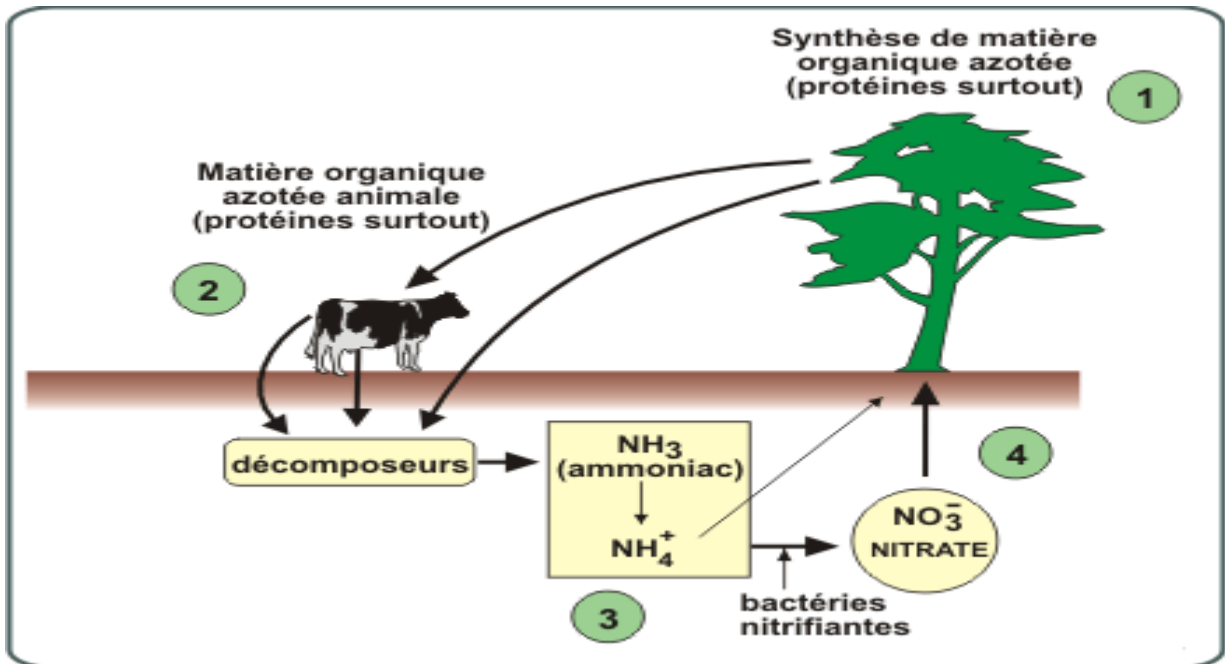
La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et du méthane ( $\text{CH}_4$ ) à travers les processus de la respiration et de la fermentation reliés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N). Le di azote est le premier en importance dans l'atmosphère terrestre (78%) (Newton, 1998).

L'azote est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Il est très fréquemment le facteur clé de la production agricole car la concentration des formes d'azote assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance des plantes. L'azote moléculaire ( $\text{N}_2$ ), constituant majeur de l'atmosphère, mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains microorganismes procaryotes appelés fixateurs de  $\text{N}_2$ , qui sont soit libres, soit symbiotiques.

### **I-1 Le cycle de l'azote**

L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques (les acides aminés et protéines, en particulier) (Zahran, 1999). Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) ou, parfois, d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Drevon, 2004)

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des microorganismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée ; et le cycle recommence.



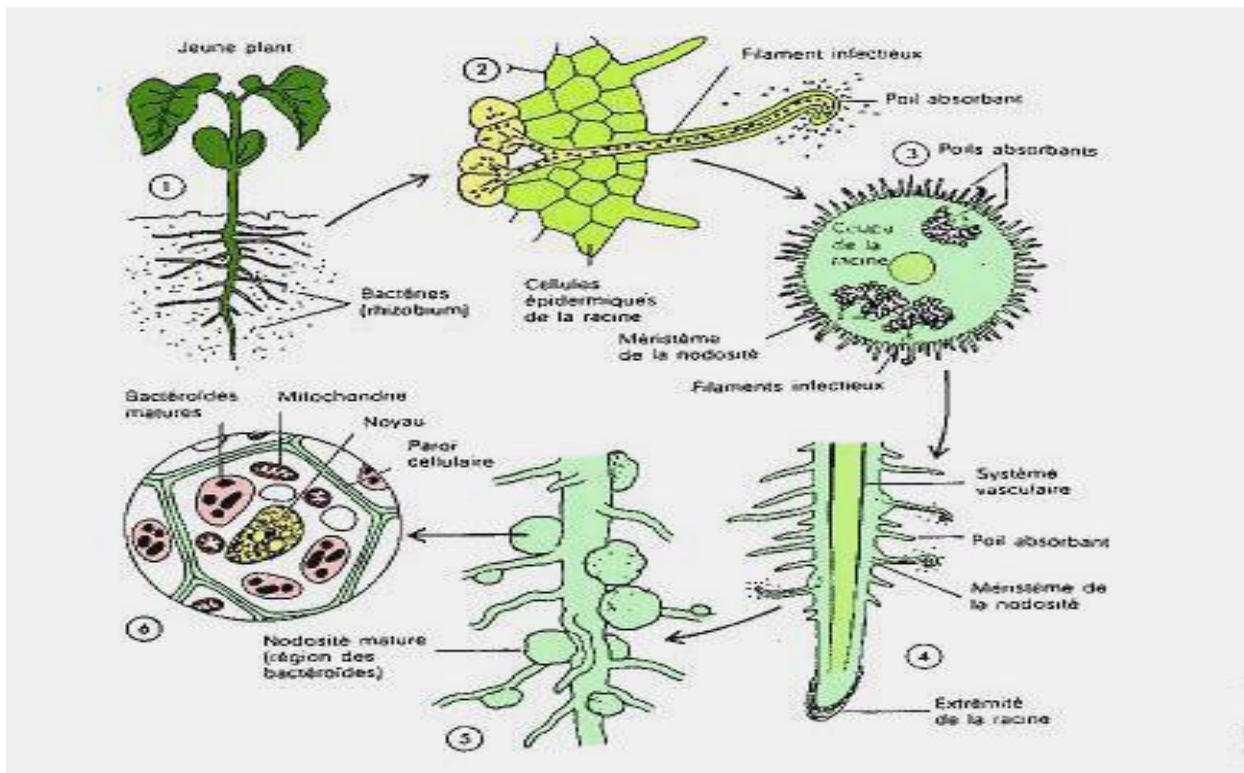
**Figure 1 :** Cycle de l'azote

1. Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions  $\text{NO}_3^-$  puisés dans le sol.
2. Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des acides aminés fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal.
3. Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions  $\text{NH}_4^+$ .
4. D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le  $\text{NH}_4^+$  en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion  $\text{NH}_4^+$  qui se forme directement à partir d'ammoniac.

## I-2 Symbiose légumineuse-rhizobium

La symbiose commence par l'attachement des bactéries (ou microsymbionte) aux poils absorbants des racines de la légumineuse en germination ; on pense que cette liaison initiale dépend d'une reconnaissance cellulaire entre des molécules de surface comme des glycoprotéines des bactéries et de la plante. La bactérie est encapsulée dans une poche de la paroi cellulaire et portée dans les profondeurs de la racine par la formation d'un filament infectieux constitué principalement de cellulose. Les cellules corticales sur l'extérieur de la racine se différencient pour former un méristème, un tissu végétal

formé de cellules indifférenciées, siège de divisions rapides et nombreuses, situées dans les régions de croissance de la plante, qui grandit et fait saillie pour former une nodosité. Les filaments infectieux qui prolifèrent libèrent alors les bactéries dans le cytoplasme des cellules hôtes, après avoir été recouvertes d'une membrane spéciale synthétisée par l'hôte, connues sous le nom de bactéroïdes. Au sein de cet environnement extrêmement protecteur, les bactéries se différencient finalement pour atteindre un stade de fixation de l'azote, en réprimant les gènes de la nitrogénase et des cytochromes spécifiques des bactéroïdes (Pelmont, 1995).



**Figure 2 :** Représentation schématique de la symbiose

L'établissement de la symbiose plante-microorganisme est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, entre la bactérie et la plante-hôte (Long, 1996). La plante produit des composés (des flavonoïdes) qui attirent et activent les bactéries fixatrices d'azote autour des racines. Par un phénomène de reconnaissance, les bactéries s'agglutinent sur les poils absorbants et forment un cordon infectieux qui va pénétrer dans la racine. Sous l'action

des bactéries, le poil absorbant se déforme selon une allure bien particulière. Arrivées au niveau des vaisseaux conducteurs les bactéries provoquent le développement d'une tumeur qui formera la nodosité (Hynes et O'Connell, 1990). Certaines cellules de la racine vont se différencier et retourner à l'état de méristème. C'est à l'extrémité de cette nodosité que l'on trouve les cellules méristématiques, tandis qu'à l'intérieur se trouve une zone riche en bactéries. C'est à cet endroit A l'intérieur des cellules végétales, ces bactéroïdes sont entourés par une membrane pér bactéroïdienne qui les isolent, en partie, du cytoplasme cellulaire. A ce stade, ces microorganismes synthétisent la nitrogénase, l'enzyme responsable de la fixation du diazote. (Hrish, 1992).

### **I-3 Mécanismes de nodulation**

Le processus de nodulation est très complexe, régulé à chaque étape par un échange de signaux nécessaires à l'interaction entre les deux espèces. La constitution d'un nodule fonctionnel peut être divisée en quatre étapes :

#### **I-3.1 Pré-infection**

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la plante permettant la croissance des bactéries de manière sélective (Savka et al., 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape et al., 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado et al., 1995). La fixation des rhizobia sur les (hydrophiles) résultant d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et le macrosymbiot (

#### **I-3.2 L'infection**

L'étape préalable à l'infection s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires (section 4.1). Par la suite, il s'ensuit l'attachement des bactéries à la surface des poils absorbants. Il a été proposé que des leptines végétales, protéines produites par les plantes à la surface des poils absorbants racinaires soient responsables de cette adhésion en se liant à des polysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne (Laus et al., 2006, Williams et al., 2008). De plus, des protéines d'adhésion sont sécrétées par la bactérie comme la ricadhésine identifiée chez de

nombreux rhizobiums (Smit et *al.*, 1987). les LPS jouent un rôle dans la suppression des réactions de défenses de la plante au cours de l'infection (Tellstrom et *al.*, 2007). Ils jouent aussi un rôle majeur dans l'adaptation des rhizobiums contre les stress environnementaux (Skorupska et *al.*, 2006).

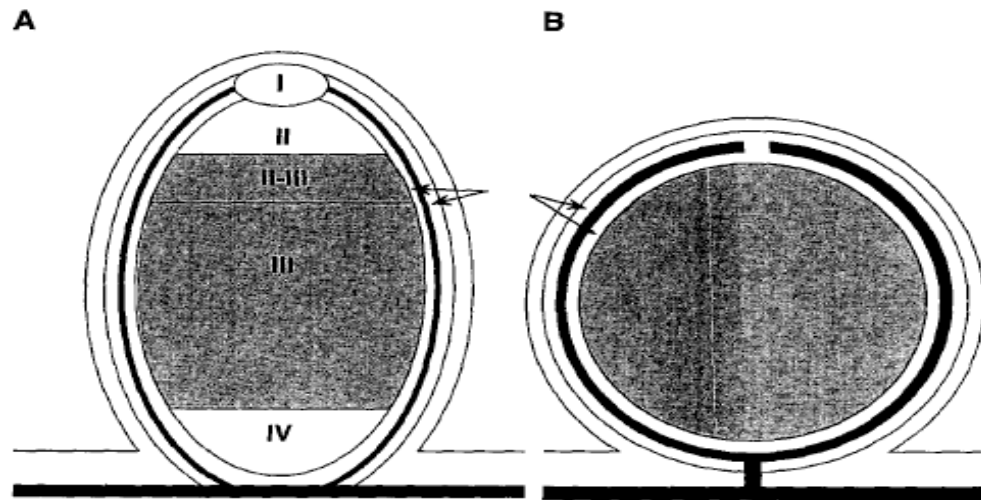
On distingue deux types d'infection : la voie intracellulaire qui est la plus étudiée et la voie intercellulaire (ou «crack-entry»). Au cours de l'infection intracellulaire, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale.

### **I-3-3 Développement du nodule**

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi, 2000). Les nodules de type indéterminé (*M. truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*L. japonicus*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des Rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée (Timmers et *al.*, 1999).

Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius et *al.*, 2000). De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de pré-infection constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (van Brussel et *al.*, 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du nodule primordium en formation. L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de pseudonodules suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule (Fang et Hirsch, 1998). De plus, les facteurs Nod produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante. Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus, mais il semble

que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine (Mathesius et *al.*, 1998 ; Boot et *al.*, 1999) et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Mathesius et *al.*, 2000). Les flavonoïdes sont susceptibles de provoquer l'accumulation de l'auxine en réduisant son oxydation de manière directe (substrats de l'enzyme) ou indirecte (en réagissant avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Mathesius, 2001). Leur rôle dans l'inhibition du transport de l'auxine est également supposé (Brown et *al.*, 2001). Des travaux récents montrent que l'extinction par la technique d'ARN interférant de l'expression du gène de la chalcone synthase (CHS) chez *M. truncatula* entraîne une augmentation du transport de l'auxine associée à une inhibition de la nodulation (Wasson et *al.*, 2006



**Figure 4 :** Types nodulaires chez les légumineuses

Nodule de type indéterminé (A) présentant une zone méristématique (I), une zone de préfixation (II), une zone de fixation (III) et une zone de sénescence (IV). Nodule de type déterminé (B). pn : parenchyme nodulaire (Pawlowski et Bisseling, 1996).

### I-3.4 Structure du nodule

L'infection du nodule indéterminé se fait par sa base, ce qui établit un gradient de différenciation et définit plusieurs zones :

- a. **la zone méristématique** (zone I) située à l'apex. Cette zone est toujours dépourvue de bactéries.
- b. **la zone de préfixation (zone II)** qui contient les cellules corticales nouvellement

produites par le méristème et qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroïdienne, et leur différenciation en bactéroïdes commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.

- c. **l'interzone II-III** dans laquelle la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplast.
- d. **l'azone de fixation** (zone III) où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- e. **l'azone de sénescence** (zone IV) qui est présente chez les nodules âgés. Les nodules de légumineuses présentent une structure similaire à celle d'une tige avec les tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par les rhizobia. De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve :
  - le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses;
  - le cortex moyen ;
  - les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle ;
  - le cortex interne formé de une à trois couches de cellules ;
  - le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les Rhizobia et des cellules non infectées plus petites.

## **II- Les légumineuses**

### **II-1 Généralités**

Une des plus importantes familles parmi les dicotylédones qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales, comprenant des plantes herbacées, des arbres, des arbustes ou des lianes, à feuilles habituellement composées, souvent trifoliolées, rarement simples, généralement avec des stipules. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Les fleurs, pentamères avec 10 étamines, ou parfois plus, caractéristiques, ressemblent souvent à des papillons. Fruit en gousse uniloculaire s'ouvrant en deux valves séparées et contenant de nombreuses graines. (Fermand Wathan, 1997). De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéine et d'huiles végétales (Graham et al, 2003). Parmi

ces légumineuses ; on peut citer par exemples :le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), la féve(*Vicia sativa*), le niébé(*Vigna*), la lentille(*Lens esculenta*), la cacahuète(*Arachis hypogaea*).

## **II-2 Classification :**

Les légumineuses représentent une superfamille chez les angiospermes ; de la famille des Leguminosae, de l'ordre des Fabales, la sous classe des Rosidae et la classe des Dicotylédones. Elles sont divisées en trois sous familles :les Mimosoïdées, les Caesalpinioïdées et les Papilionoïdées. Elles comprennent plus de 650 genres et 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae*, en terme de divers

### **II-2.1 Les Papilionoideae**

La sous-famille monophylétique des Papilionoideae renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent 1995).

Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoïdes et Phaseoloïdes (Figure 2), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton *et al.* 2003). Elle est cosmopolite et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Labat 1996). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd *et al.* 2001). Les Papilionacées sont utilisées pour la production des graines alimentaires (pois, haricot...), pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage (luzerne, sainfoin, trèfle...), le soja est utilisé sur une large échelle dans l'élevage industriel.

### **II-2.2 Les Mimosoideae**

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.* 2001).

### II-2.3 Les Caesalpinoideae

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles à l'extérieur (Judd *et al.* 2001).

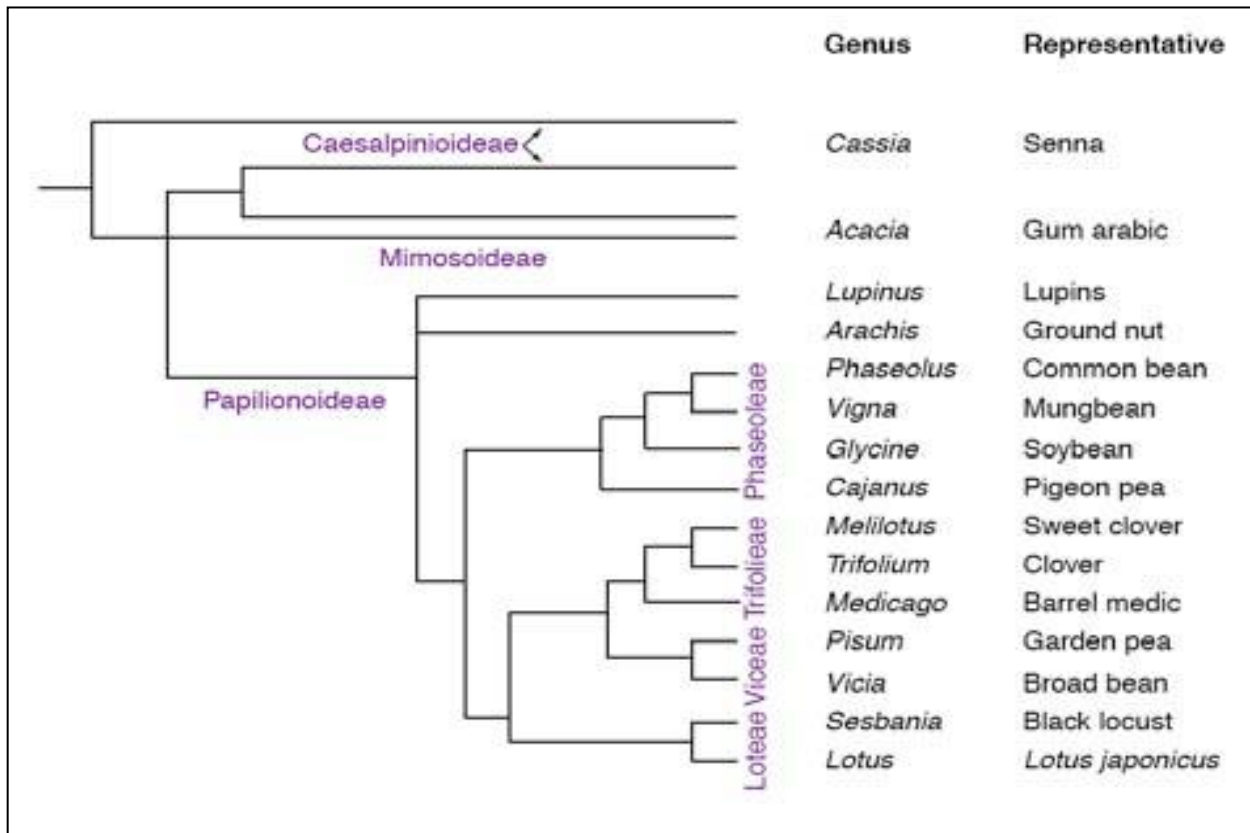


Figure 5. Phylogénie des légumineuses (Udvardi *et al.*, 2005).

### II-3 Intérêts scientifiques des légumineuses en général

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

Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les

graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet *et al.*, 2006).

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

### **II-3.1 Intérêt agronomique des légumineuses**

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

### **II-3.2 Intérêt alimentaire des légumineuses**

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des légumineuses. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale (Journet *et al.*, 2001). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche) (Baudoin, 2001). Parmi ces légumineuses riches en protéines mais peu exploitées on cite *lablabus purpureus*.

## **III- Genre Vicia**

### **III-1 Origine botanique et systématique**

D'après Odeh (1999), cette papilionacée est anciennement connue et considérée comme originaire du bassin méditerranéen. Il existe de nombreuses formes spontanées. Le genre *Vicia*; du grec = bichon, vesce et du latin; *vinare*: lier, entre lacer ; allusion aux tiges souvent entre

lacées et grimpantes et il est considéré comme originaire du bassin méditerranéen. Pour **Belbadjaoui, (2005)** la Vesce fait partie de la grande famille botanique des légumineuses qui comprend plus de 400 genres et 1400 espèces sur l'ensemble du globe. La taxonomie de cette plante est comme suit:

**Tribu :** viciae

**Embranchement:** Spermatophytes.

**Sous embranchement:** Angiosperme.

**Ordre:** Dialypétales.

**Série:** Calciflores.

**Famille:** Légumineuses.

**Sous famille:** Papilionacées.

**Genre:** *Vicia* sp.



*Vicia ervilia* *Vicia sativa*



*Vicia faba major*

**Figure 6 :** quelques espèces de vicia

### **III-2 Description morphologique**

Les Vesces sont des plantes herbacées, à feuilles ayant 2 à 3 folioles et terminées par une vrille simple ou ramifiée qui correspond à la transformation de la partie supérieure du pétiole et des folioles supérieurs. Les fleurs, de couleur très variées, sont disposées en grappes ou insérées presque directement à l'aisselle des feuilles (**Bonnier, 1990**). Les racines sont pivotantes à chevelu dense présentant des nodosités, les tiges sont assez ramifiées à la base, grimpantes non cylindrique souvent carrés et creuses, les grains sont subsphériques, de 3 à 3.5 mm de diamètre des couleurs grise, brun, verte ou blanche et le cycle de développement peut être subdivisé en cinq phases phénologiques : la levée, la formation des pousses, le bourgeonnement, la floraison et la maturation (**Daikh, 1994**).

### **III-3 Répartition géographique**

L'analyse des données édapho-climatique montre que la répartition géographique des vesces spontanées est dépendante de l'altitude des sites et des facteurs climatiques.

#### **III-3.1 Dans le monde**

La plupart des espèces de vesces sont indigènes aux régions méditerranéennes du sud européen. Les pays qui pratiquent la production de la semence de cette plante sont : Portugal, Allemagne, Belgique, Grande Bretagne, Hollande, Italie, Turquie et les USA ainsi que les pays Arabe comme la Syrie, L'Iraq, la Tunisie et le Liban. Les espèces les plus rencontrées dans le monde sont : La Vesce cultivée ou commune (*Vicia sativa* L), la Vesce velue (*Vicia villosa* Roth), la vesce de Hongrie (*Vicia pannonica*) et la vesce ervilière (*Vicia ervilia* L) (Odeh, 1999).

#### **III-3.2. En Algérie**

La culture de la vesce se développe autour des anciens centres de Kabylie de la Mitidja du Chélif et dans les hauts plateaux (Odeh, 1999). Elle est utilisée en association avec l'avoine seulement pour la production de foin. Cette culture représente plus de 70% des fourrages artificiels consommés en sec. Les superficies réservées à cette culture diminuent plus de 50%.

En 1996, la vesce occupe une superficie de 690Ha et diminue ensuite, en 1998 à 351Ha puis régresse en 2001 pour à voisiner les 60Ha (Rezzoug, 2003). Les variétés utilisées en Algérie sont : Chélif, Languedoc, Bulgarie, Roumanie, Draa Almizane, Kabylie, Hongrie (Tahri et *al.*,1997).

# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

## **I. Caractérisation phénotypique des isolats**

### **I.1. Caractères culturels des isolats et examen microscopique**

#### **I.1.1. Croissance sur le milieu YMA**

Un inoculum est ensemencé sur le milieu YMA et les caractéristiques morphologiques sont examinées au bout de 24 heures à 7 jours. Les principaux critères retenus sont : la taille des colonies, la forme, la couleur et l'opacité.

#### **1.2. Test du BTB**

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YMA a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré Bleu de Bromothymol. Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 28°C pendant 8 jours.

Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Les bactéries qui montrent une réaction alcaline dans ce milieu qui font virer sa couleur vers le bleu, alors que les bactéries qui effectuent une réaction acide qui changent la couleur verte du milieu en jaune (Somasegaran et Hoben, 1994).

#### **1.3. 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).

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).

## **2. Tests biochimiques**

### **2.1. Réduction des nitrates**

Ce milieu liquide permet de mettre en évidence la présence d'une enzyme du métabolisme énergétique : la nitrate réductase. On ensemence le bouillon nitraté avec quelques gouttes de suspension bactérienne de chaque souche puis on incube pendant 8 jours à 28 °C.

Après incubation, on vérifie que le bouillon est trouble (présence de culture). On ajoute le réactif de Griess (NRI + NR II).

- Une coloration rouge du milieu indique : Nitrate Réductase positive
- Une coloration jaune du milieu montre un : Nitrate Réductase négative

Si le milieu est jaune, on ajoute la poudre du zinc:

- Si la couleur du milieu vire vers le rouge ça indique : Nitrate Réductase négative.
- Si la couleur du milieu reste jaune ça indique : Nitrate Réductase positive.

## 2.2. La catalase

On prend une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune. Le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase (Marchal et *al.*, 1991).

## 2.3-Production d'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une enzyme « tryptophanase ». Dans une (riche en tryptophane). Onensemence le milieu eau peptonée exempte d'indole avec quelques gouttes de suspension bactérienne de chaque souche puis on incube pendant 8 jours à 28 °C. Après incubation on ajoute quelques gouttes du réactif de Kovacs. La présence d'indole révèle la dégradation du tryptophane se traduisant par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

## 3. Tests nutritionnels

### 3.1. Assimilation de la source de carbone

Ce test a été mis en œuvre sur le milieu YMA où l'extrait de levure est remplacé par 1 g de  $KNO_3$  et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Xylose, Galactose, Glucose, Lévoluse. Les ensemencement sont réalisés par des spots avec 10 microlitres d'une suspension bactériennes de  $10^8$  cellules/ml sur YMA. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 8 jours.

## 4. Tests physiologiques

La population bactérienne peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux comme le stress osmotique, stress acide et choc thermique.

La tolérance de différents isolats à ces différents facteurs a été évaluée par trois tests différents :

#### **4.1. Effet du pH**

L'ensemencement est réalisé en spots avec 10 microlitre de suspension bactériennes sur YMA ajusté à différents pH: 4, 5, .8, 9 ,10 et incubé à 28°C pendant 8 jours.

#### **4.2. Tolérance au chlorure de sodium**

Pour tester la tolérance des isolats au NaCl, nous avons préparé le milieu YMB à différentes concentrations en NaCl: 1%, 2%, 3%et 5%. La tolérance au Na Cl est étudiée après l'incubation à28°C pendant 8 jours.

#### **4.3. Effet de la température**

L'étudie de l'effet de température sur la croissance est réalisée sur milieuYMA par ensemencement en utilisant la méthode des spots avec 10 microlitres de suspension bactérienne puis incubation à différentes températures :28°C, 35°C, 40°C et45°C. La lecture est réalisée après 8 jours.

# Chapitre 3

## Résultats et discussion

## 1. Caractérisation phénotypique des isolats

### 1.1. Caractères cultureux des isolats et examen microscopique

#### 1.1.1. Croissance sur le milieu YMA

La croissance sur le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) est détectable au bout de 24 à 48 heures d'incubation à 28°C. Les isolats donnent des micro-colonies circulaires de taille variable, lisses, convexes, de couleur blanchâtre ou crème (figure 7). Le genre *Rhizobium* est caractérisé par des colonies qui sont généralement visibles en 48 heures, il a une croissance rapide. Les colonies sont blanches ou beiges, circulaires, convexes, semi-translucides ou opaques, élevées et mucilagineuses.



Figure7 :Croissance sur YMA

#### 1.1.2. Test du BTB

Le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6.50% de nos isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB et virent le milieu vers le jaune après 24 heures d'incubation, il s'agit des souches à croissance rapides. Les autres souches qui restent (S2, S3, S15, S16, S17, S19, S22, S24, S25, S27 et S29) virent le milieu vers le bleu après une durée de 5 à 8 jours.

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (Jordan, 1984).

**Tableau :** Résultats du test au bleu de bromothymol

Souches	Alcalinisation	Acidification	Souches	Alcalinisation	Acidification
S1	-	+	S16	+	-
S2	+	-	S17	+	-
S3	+	-	S18	-	+
S4	+	-	S19	+	-
S5	-	+	S20	-	+
S6	-	+	S21	-	+
S7	-	+	S22	+	-
S8	-	+	S23	-	+
S9	-	+	S24	+	-
S10	-	+	S25	+	-
S11	-	+	S26	-	+
S12	-	+	S27	+	-
S13	-	+	S28	-	+
S14	-	+	S29	+	-
S15	+	-			



**Figure8 :** Croissance sur YMA + BTB

### 1.1.3. Coloration de Gram

L'observation microscopique permet d'observer des bacilles roses à Gram négatif. L'ensemble des résultats obtenus relatifs à l'aspect macroscopique et microscopique suggèrent que les isolats ont la même description des rhizobia.

## Figure coloration de Gram

### 2.2. Tests biochimiques 2.2.1. Réduction des nitrates

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue des caractères taxonomiques importants (Coffin *et al.*, 2006). Cette étude consiste à mettre en évidence le métabolisme des nitrites ou la disparition des nitrates initiaux. Dans les milieux biologiques, la transformation des ions  $\text{NO}_3^-$  en ions  $\text{NO}_2^-$  ne peut s'effectuer que sous l'action d'une enzyme : la nitrate réductase qui est présente dans tous les organismes susceptibles de métaboliser le nitrate tels que les plantes, les champignons ainsi que quelques espèces de levures et bactéries (Idrissi, 2006).

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

Après 8 jours d'incubation l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs 1 et 2 du nitrate réductase a montré un virage de la couleur du milieu au rouge chez tous nos isolats, indiquant que le nitrate a été réduit en nitrite, donc le milieu contient les ions nitrites indiquant un résultat positif (tableau 2).

**Tableau 2** : Les résultats de réduction des nitrates.

Souches	Nitrate réductase	Souches	Nitrate réductase
S1	+	S16	+
S2	+	S17	+
S3	+	S18	+
S4	+	S19	+
S5	+	S20	+
S6	+	S21	+
S7	+	S22	+
S8	+	S23	+
S9	+	S24	+
S10	+	S25	+
S11	+	S26	+
S12	+	S27	+
S13	+	S28	+
S14	+	S29	+
	+		

### 2.2.5. La catalase

Ce test démontre la présence de la catalase, une enzyme qui catalyse la libération d'oxygène à partir peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La présence de l'enzyme dans un isolat bactérien est évidente lorsqu'un l'inoculum est introduit dans le peroxyde d'hydrogène et l'élaboration rapide de bulles d'oxygène se produit. L'absence de catalase est évidente par un manque ou une faible production de bulles.

A l'exception des souches S7, S8, S9 et S16 qui donnent un résultat négatif (par un manque ou une faible production de bulle d'air sur la lame après l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ce qui signifie qu'elles ne possèdent pas la catalase. La plupart des isolats de cette étude présente une catalase positive (Tableau 3). Selon Vincent (1981), la présence de la catalase est l'une des caractéristiques principales des souches de *Rhizobium*.

**Tableau 3 :** Résultat de réaction de la catalase sur les souches étudiées.

Souches	Catalase	Souches	Catalase
S1	+	S15	+
S2	+	S16	-
S3	+	S17	+
S4	+	S18	+
S5	+	S19	+
S6	+	S20	+
S7	-	S21	+
S8	-	S22	+
S9	-	S23	+
S10	+	S24	+
S11	+	S25	+
S12	+	S26	+
S13	+	S27	+
S14	+	S28	+
		S29	+

### 2-2- 3-Production d'indole

L'eau peptonée est un milieu permettant la croissance des germes non exigeant. Elle est surtout utilisée pour la recherche de la production d'indole par les microorganismes.

Après incubation, la présence d'indole est indiquée par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du milieu. A l'exception de S2, S6, S10 qui n'ont pas la capacité de produire l'indole, la plupart des souches produisent le produit (tableau 4).

**Tableau 4 :** Résultats de test de production d'indole.

Souches	EPEI	Souches	EPEI
S1	+	S16	+
S2	-	S17	+
S3	+	S18	+
S4	+	S19	+
S5	+	S20	+
S6	-	S21	+
S7	+	S22	-
S8	+	S23	+
S9	+	S24	+
S10	-	S25	+
S11	+	S26	+
S12	+	S27	+
S13	-	S28	+
S14	+	S29	+
S15	+		

(+) résultat positif, (-) résultat négatif.

## 2.3. Tests nutritionnels

### 2.3.1. Assimilation de la source de carbone

Ce test est réalisé dans le but de voir la source carbonée préférée par les différentes souches étudiées (tableau 5).

**Tableau 5:** Résultats du métabolisme des sucres par les isolats testés.

Souche \ Sucres	Galactose	Glucose	Lévulose	Xylose
S1	+	+	+	+
S2	+	+	+	+
S3	+	+	+	+
S4	+	+	+	+
S5	+	+	+	+
S6	+	+	+	+
S7	+	+	+	+
S8	+	+	+	+
S9	+	+	+	+
S10	+	+	+	+
S11	+	+	+	+
S12	+	+	+	+
S13	+	+	+	+
S14	+	+	+	+
S15	+	+	+	+
S16	+	+	+	+
S17	+	+	+	+
S18	+	+	+	+
S19	+	+	+	+
S20	+	+	+	+
S21	+	+	+	+
S22	+	+	+	+
S23	+	+	+	+
S24	+	+	+	+
S25	+	+	+	+
S27	+	+	+	+
S28	+	+	+	+
S29	+	+	+	+

Le tableau montre que les souches utilisent parallèlement les sucres, Le glucose et le galactose(monosaccharide),le xylose et lévulose(disaccharides) sont dégradés par toutes les souches.

**Allen et Allen (1950)** ont constaté que tous les *Rhizobium* à croissance rapide utilisent facilement les mono et les disaccharides et de manière restreinte les Triest les sucres contenant des fonctions alcools, de même **Graham (1964 a/b)** a montré que toutes les souches de *Rhizobium* sont capables de se développer sur des composés représentant des tri et disaccharides, des aldoses et polyalcools.

### **2. 3 . Des tests biochimique**

La flore du sol, les bactéries nodulant les légumineuses, les rhizobia en particulier, sont exposés à l'action de divers facteurs abiotiques, notamment les sels, le pH et la température. Il est utile de soumettre les isolats, en présence de souches de *Rhizobium*, à ces facteurs.

#### **2. 4. 1 Effet de pH**

Au-delà du pH optimum de croissance (pH 6.8), on observe une croissance normale aussi au pH légèrement acide (pH 4 et 5) ou basique (pH 8, 9 et 10).Ceci est en accord avec la bibliographie où les rhizobiaou B.N.L. se cultivent aux pH intermédiaires (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970, 1982 ; de Lajudie, 2004 ;Struffi, 1998),sauf dans le cas de la souche S7qui n'a pas poussé sur le YMA à pH 4et5.

**Tableau 6:** Effet de PH sur la croissance des souches testés.

PH souches	PH4	PH5	PH8	PH9	PH10
S1	+	+	+	+	+
S2	-	-	+	+	+
S3	+	+	+	+	+
S4	+	+	+	+	+
S5	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+
S7	+	+	+	+	+
S8	+	+	+	+	+
S9	+	+	+	+	+
S10	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+
S12	+	+	+	+	+
S13	+	+	+	+	+
S14	+	+	+	+	+
S15	+	+	+	+	+
S16	+	+	+	+	+
S17	+	+	+	+	+
S18	+	+	+	+	+
S19	+	+	+	+	+
S20	+	+	+	+	+
S21	+	+	+	+	+
S22	+	+	+	+	+
S23	+	+	+	+	+
S24	+	+	+	+	+
S25	+	+	+	+	+
S27	+	+	+	+	+
S28	+	+	+	+	+
S29	+	+	+	+	+

(+) bonne croissance

(-) pas de croissance

L'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du *Rhizobium* et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (Appunu

etDhar, 2006).Les souches de *Rhizobium* peuvent se développer à un pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).Les Rhizobiums adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditionsacides du sol (Zahran, 1999).

### 2.4.2. Tolérance au chlorure de sodium

On remarque que les différents isolats se développent aux différentes concentrations en NaCl testées (tableau 7).

**Tableau7** :Effet de Nacl sur la croissance de souches testées.

Souches	1%	2%	3%	4%	5%
S1	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+
S4	+	+	+	+	+
S5	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+
S7	+	+	+	+	+
S8	+	+	+	+	+
S9	+	+	+	+	+
S10	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+
S12	+	+	+	+	+
S13	+	+	+	+	+
S14	+	+	+	+	+
S15	+	+	+	+	+
S16	+	+	+	+	+
S17	+	+	+	+	+
S18	+	+	+	+	+
S19	+	+	+	+	+
S20	+	+	+	+	+
S21	+	+	+	+	+
S22	+	+	+	+	+
S23	+	+	+	+	+
S24	+	+	+	+	+
S25	+	+	+	+	+
S26	+	+	+	+	+
S27	+	+	+	+	+
S28	+	+	+	+	+
S29	+	+	+	+	+

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

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

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

### **2.4.3. Effet de la température**

Les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 28°C jusqu'à 45°C. Seules les souches S2, S3, S4, S7, S17 et S29 sont incapables de croître à 45°C. La souche S2 est incapable de se multiplier à 35°C et 40°C.

**Tableau 8** :Effet de la température sur croissance des souches testées

Codes souches	45°	40°	35°	28°
S1	+	+	+	+
S2	-	-	-	+
S3	-	+	+	+
S4	-	+	+	+
S5	+	+	+	+
S6	+	+	+	+
S7	-	+	+	+
S8	+	+	+	+
S9	+	+	+	+
S10	+	+	+	+
S11	+	+	+	+
S12	+	+	+	+
S13	+	+	+	+
S14	+	+	+	+
S15	+	+	+	+
S16	+	+	+	+
S17	-	+	+	+
S18	+	+	+	+
S19	+	+	+	+
S20	+	+	+	+
S21	+	+	+	+
S22	+	+	+	+
S23	+	+	+	+
S24	+	+	+	+
S25	+	+	+	+
S27	+	+	+	+
S28	+	+	+	+
S29	-	+	+	+

Les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räsänen, 2002). Bowen et Kennedy (1959) ont constaté que plusieurs *Rhizobium* sont capables repousser à 40°C.

Les *Rhizobium* sont criblés sur la base de la résistance au pH, la résistance à la température, résistance à la salinité et résistance aux antibiotiques (Rajeswari,2017).Les contraintes abiotiques, telles que la sécheresse, les extrêmes de température, salinité du sol, l'acidité, alcalinité et provoque de graves pertes de rendement. La réponse des légumineuses à différents contraintes dépend de la réaction de la plante hôte, mais la réaction peut être influencée par le *Rhizobia* et le processus de symbiose (Yang et al., 2009).

Les *Rhizobium* sont décrits comme des bactéries du sol qui ont la capacité d'infecter la racine cheveux de légumineuses et pour induire la formation de nodules avec fixation ultérieure de l'azote (Rajeswari ,2017).



# Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules du genre *Vicia*. Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux rhizobiums (selon Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994, Jordan, 1984.

A travers les résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques, ont montré que l'ensemble des isolats présentent des caractères proches des bactéries de la famille de *Rhizobiaceae* (morphologie des colonies sur YMA, vitesse de croissance, présence des enzymes spécifiques au processus de la nodulation).

En effet l'aspect, la couleur, la forme des colonies sur le milieu YMA, la morphologie des cellules, la croissance rapide YMA+BTB peuvent nous orienter vers le genre *Rhizobium* (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984).

Une ressemblance apparaît dans la culture de ces souches sur milieu YMA+BTB où une modification de la couleur initiale du milieu vers le jaune (acidification) pour les isolats à croissance rapide et vers le bleu-vert (alcalinisation) pour les isolats à croissance lente a été observée.

Les résultats des tests nutritionnels montrent une assimilation préférentielle des sucres selon les isolats. Le Glucose, Xylose, lévulose et le galactose sont bien assimilés par les souches.

Nos isolats répondent à la majorité des caractères du genre *Rhizobium*, dans l'influence des facteurs abiotiques (effet du pH, NaCl et la température). Les isolats ont été capables de tolérer une gamme assez large de pH allant de 4 à 10 avec des taux variables et d'autres qui sont inhibés par certains pH. Pour le stress salin on a constaté que nos isolats sont résistants aux concentrations élevées ce qui montre que ces isolats sont des osmotolerants.

La tolérance à la température est très importante pouvant aller jusqu'à 45°C pour les souches à croissance rapide, ces dernières poussent aussi à des valeurs de température très basses.

Perspectives.....Ou sont les perspectives ?

Perspectives :

1-D étendre la caractérisation phénotypique avec l'étude d'un plus grand nombre de caractères

2- Étudier le potentiel fixateur d'azote des souches

3- Compléter cette étude par une approche génotypique en utilisant les techniques de biologie moléculaire (PCR/RFLP de l'ADNr16, des gènes symbiotiques, des , afin de déterminer avec précision la position taxonomique de nos souches ,

# Annexe 01

## Milieux de culture utilisés

### Composition de milieu YMB (YeastManitolBroth) en g/l (Vincent.,1970)

Mannitol	10.00
Extrait de levure	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0.20
NaCl	0.1
Eau distillée	1.00 L
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

### Composition de milieu YMA (YeastManitol Agar) en g/l (Vincent.,1970)

YMB	1.00 L
Agar	15.00
Ph	6.80

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

YMB	1.00 L
Solution stock de bleu de BTB	5.00 ml
Agar	15.00
pH	6.80

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

## Annexe 02

### Coloration de Gram

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

- 1) Déposer une goutte d'eau distillée stérile au centre d'une lame propre.
- 2) Prélever une petite quantité d'une colonie à l'aide d'une anse de platine.
- 3) Mélanger avec la goutte d'eau, sécher par passage sur la flamme d'un bec bunsen.
- 4) Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute.
- 5) Éliminer l'excès du violet de Gentiane avec du Lugol et ensuite couvrir la lame avec leLugol pendant une minute.
- 6) Décolorer au mélange Alcool-Acétone jusqu'à la décoloration totale du frottis en maintenant la lame en position inclinée.
- 7) Couvrir la lame d'une solution de Fuchsine pendant 1 minute.
- 8) Laver à l'eau, sécher la lame avec du papier absorbant.
- 9) Déposer une goutte d'huile de Paraffine ou de vaseline stérile sur le frottis, et observer au microscope (avec une goutte d'huile à immersion ,au grossissement 1000X).

## Références bibliographiques

**Bowen G. D. and Kennedy M. M. (1959).**Effect of high soil temperatures on *Rhizobium* spp. Queensl. *J. Agric. Sci.* .pp. 16; 177-197.

**Allen E. K. and Allen O. N. (1950).**Biochemical and symbiotic properties and symbiotic properties of the Rhizobia. *Bact. Rev.* pp. 14; 273-330.

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

**Baudoin T. (2001).** Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and nod genes, in: Martinez-Romero E., He mandez G. (Eds.), Highlights of Nitrogen fixation Research, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 295- 299.

**Beck D.P., Materon L.A., Afandi F. (1993).**Practical *Rhizobium*–legume technology manual, ICARDA. (Ed), Syria, P.389.

**Benjamin, Peret(2007),** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizal chez l'arbre tropical Casuarina glauca-Université Montpellier II -sciences et technique du large doc UFR science :4.

**Boot KJM, van Brussel AAN, Tak T, Spauk HP et Kijne JW (1999)** Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Mol Plant Microbe Interact.* **12**: 839-844.

**Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. and Li, Y., (1995)-**Characteristics of *Rhizobium trianshanense* sp. nov. a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1), 153-159.

**Claudel-Renard C. (2003) :** Inférence fonctionnelle et prédiction de voies métaboliques. Application à la bactérie fixatrice d'azote *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier Toulouse III. France.

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

**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.

**Drevon, J.J, P. Hinsinger** (2004)- Nutrition phosphatée et réponse des plantes et de la symbiose rhizobienne à la déficience en phosphore.

**Dreyfus B, Dommergues Y.** 1981. Nodulation of Acacia species by fast-and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Applied and Environmental Microbiology.* **41**: 97–99.

**Graham P. H. (1964a):** The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* pp. 35; 511-517.

**Graham P. H. (1964b):** Studies on the utilisation of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.Serol.* pp.30; 68;72.

**Howieson J.G., et Dilworth M.J .,** 2016 :Working with *Rhizobia* ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale. p :312.

**Hrishi, A.M.,** (1992) - Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**: 211-237.

**Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P., Young C.C.,** 2005: Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia* 49 pp 577-584.

**Hynes, M. F, and O’Connell, M.P.,** (1990) - Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J.Microbiol.* **36**: 864-896.

**Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L., van Berkum, P.,** (1995)-Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. *J. Environ. Qua on nodulation and nitrogen fixation of legumes. J. Environ. Qual.* 24, 1199–1204.

**Idrissi L.,** 2006 : Etude et developpement de nouvelles methodeselectrochimiques pour la determination des ions orthophosphate, nitrite, nitrate et ammonium. Thèse de doctorat d’état de l’Université Mohammed V Agdal. Maroc.

**Joffin J-N., Leyval Guy.,** 2006: Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4e edition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne .

**Jordan D.C.,** 1984 : Family III: Rhizobiaceae. In: Krieg N.R. et Holt J.C (Eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Williams et Wilkins. Baltimore. USA. pp 234-244.

**Jourmet, P., Graham, H., Allan, D.** 2001. Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In *Nitrogen Fixation : From Molécules to Crop Productivity.* Pedrosa F.O., Hungria M. & Yates M.G. eds., Newton WE (Kluwer Academie Publishers), Dordrecht (The Netherlands), pp. 506-514.

**Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL. 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris .

**Newton, W. R. (1998)**-Nitrogénase : fonction et évaluation Bull soc .Fr .Microbiol 13 :238.

**Odeh N., (1999)** - Contribution à la détermination de la valeur nutritive des grains de quelques espèces de vesce nouvellement introduites en Algérie (Hauts plateaux): *Vicia* VN et VD. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie, Université de Batna, p53.

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

**Pelmont J. (1995)** – Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Vol 2. p. 541-572. Office des Publications .Universitaires.

**Pinochet, J., Freire, I., Schrank, K. (2006).** Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum bv phaseoli*. *Mircen Journal*. 3 : 289-295.

**Rajeswari P., Aishwaryaalakshmi B., et Jeyagowri C., 2017** : Isolation, identification et dépistage de *Rhizobium* Pour la promotion de la croissance des plantes. *International Journal of Applied Research; Inde*. 3 (1): 732-733.

**Räzänen L.A., 2002:** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland

**Rezzoug K., (2003)**- Contribution à l'étude de 3 espèces du genre *Vicia* Spp dans le semi-aride sétifien. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie, El-Tarf, 65p.

**Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.

**Struffi, P. ; V. Corich ; A. Giacomini ; A. Benguedouar ; A. Squartini ; S. Casella ; M.P. Nuti (1998)** – Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 81-89.

**Tahri E., Belabed A. & Sadki K. 1997.** Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.). *Bulletin de l'Institut Scientifique. Rebat.* **21**: 81 - 89 p.

**Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., De R., Saxena A. K., Shekhar Nautiyal C., Shilpi Mittal, Tripathi A. K., Johri B. N., 2005:** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, Vol. 89, N° 1. pp 136-150

**Udvardi MK ; Tabata s , parniske M et stougaad (2005)** Lotus japonicas legume research in fast lane. *Trends plant sci.* 10:222-228.

**Vincent J M.** (1981). Genre rhizobium the procaryotevol 1 Schlegel H G etBalows A (edsBarlinpp 818-843.

**Vincent, J.M.** (1970) - A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

**Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.M., 2009 :** bactéries rhizosphère aider plantes tolèrent le stress abiotique. Trends Plant Sei .14 (1): 1-4

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

**Zgadzaj R. ,Garrido-Oter R. , Jensen D.B ., Koprivova A ., et Radutoiu S.,2016 :** La symbiose du nodule racinaire chez *Lotus japonicus* conduit à l'établissement de communautés bactériennes distinctes de la rhizosphère, des racines et des nodules..Allemagne. 7996 – 8005 .