

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'Etudes  
En vue de l'obtention du diplôme:**

**MASTER**

**Filière : Biochimie  
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire**

***Thème***

**Caractérisation phénotypique des bactéries  
nodulant la légumineuse *Astragalus mareoticus*  
(région Fontaine des gazelles, Biskra)**

**Présenté par :**

**CHEMMAR Wassila**

**Devant le jury:**

**Président: BOUATROUS Yamina**

**Promoteur: MOKRANI Djamilia**

**Examineur : SAIDI Asma**

**M. A. Université Mohamed Khider Biskra.**

**M. A. Université Mohamed Khider Biskra.**

**M. A. Université Mohamed Khider Biskra.**

**Promotion : Juin 2014**

## **Remerciements**

- ☺ *Avant tout nous remercions DIEU (Allah) tout puissant de nos avoir donné le courage, la volonté et la patience d'achever ce travail et pour avoir guidés dans le droit chemin dans ma vie.*

*Nos remerciements vont particulièrement à:*

- ☺ *Mon promoteur Mme MOKRANI Djamila, enseignante dans le département des sciences de la nature et de la vie de l'université de Biskra, merci d'avoir bien accepté de diriger ce modeste travail.*
- ☺ *Les membres de jury, Mme BOUATROUS Yamina et Mme SAIDI Asma, je leur suis très reconnaissante Pour leur attention.*
- ☺ *A tous les enseignants qui ont participés le long de ces années à ma formation.*
- ☺ *A tous mes amis et mes collègues, je cite en particulier REZGI Madiha.*
- ☺ *A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

**MERCI A TOUS ET TOUTES.**

## **Dédicace**

*Je dédie mon travail à :*

- ② *Mes parents pour leur soutien inconditionnel et leur sacrifice. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis. Que ce travail soit pour eux un témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance ;*
  
- ② *Mes sœurs et Mes frères ;*
  
- ② *Ma grande mère ; que dieu vous accorde une longue vie ;*
  
- ② *Mes fidèles amies.*  
*Merci pour votre amitié et tous les bons moments passés et à venir ;*
  
- ② *A toutes et à tous, qu'ils trouvent en ce mémoire, ma profonde gratitude, mon éternelle reconnaissance.*

*TOUTE LA PROMOTION MASTER 2013-2014.*

**Wassila**

## Sommaire

**Remerciement**

**Dédicaces**

**Sommaire**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction**

### **Chapitre I : Revue bibliographique**

<b>I. Etablissement des symbioses rhizobiennes</b> .....	2
<b>I. 1. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L)</b> .....	2
I. 1. 1. Le genre <i>Rhizobium</i> .....	2
I. 1. 2. Caractères généraux .....	2
I. 1. 3. La nutrition azotée des <i>Rhizobium</i> .....	2
I. 1. 4. Taxonomie des B.N.L .....	3
<b>I. 2. La plante hôte</b> .....	7
I. 2. 1. Famille de plante-hôtes impliquées dans la symbiose : les légumineuses.....	7
I. 2. 2. Classification des légumineuses .....	8
I. 2. 3. La légumineuse étudiée: Astragales .....	8
I. 2. 4. Principales Astragales répertoriées .....	8
I. 2. 5. Intérêt médicinal du genre .....	9
I. 2. 6. <i>Astragalus mareoticus</i> .....	10
I. 2. 6. 1. Description .....	10
I. 2. 6. 2. Habitat .....	10
<b>II. L'infection et la nodulation</b> .....	11

II. 1 Formation des bactéroïdes .....	11
II.2. Etapes de nodulation .....	11
II.2.1. Phase de pré-infection .....	11
II.2.2. Phase de l'infection et de la formation des nodules .....	11
II.2.3. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules .....	12
II.2.4. Phase de dégénérescence .....	12
II.3. Structure des nodules .....	13
II.4. Processus de la fixation d'azote .....	14
II.4.1. Cycle d'azote .....	14
II.4.2. Fixation biologiques d'azote .....	14
II.4.2.1. Fixateurs libres .....	15
II.4.2.2 Fixateurs symbiotiques .....	15
II.4.3. Molécules clé de la fixation d'azote .....	16
II.4.3.1. Le complexe nitrogénase .....	16
II.4.3.2. La leghémoglobine .....	16
II.4.4. La réaction globale de la fixation de l'azote .....	17
II.4.5. Contraintes environnementales liées à la fixation .....	17
<b>III. Génétique de la symbiose, la nodulation et la fixation d'azote .....</b>	<b>18</b>
III.1. Les flavonoïdes et la diversité des facteurs <i>Nod</i> .....	18
III.1.1. Les flavonoïdes .....	18
III.1.2. Les facteurs <i>Nod</i> .....	18
III.2. Les gènes de nodulation .....	19
III.2.1. Les gènes <i>nod</i> communs .....	19
III.2.2. Les gènes <i>hsn</i> .....	19
III.2.3. Les gènes <i>nodD</i> .....	19
III.3. Aspects moléculaires de la fixation d'azote .....	19
III.3.1. Les gènes <i>nif</i> .....	20

III.3.2. Les gènes <i>fix</i> .....	20
-------------------------------------	----

## **Chapitre II: Matériel et Méthodes**

<b>I. Isolement des bactéries à partir des nodules</b> .....	21
I.1. Présentation de la région d'étude.....	21
I. 2. Collecte des nodules .....	22
I.2. Conservation des nodules .....	23
I.3. Stérilisation des nodules .....	24
I.4. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés .....	24
<b>II- Purification et conservation des isolats</b> .....	25
II. 1. Principaux milieux utilisés .....	25
II. 2. Purification des isolats .....	25
II. 3. Vitesse de croissance .....	25
II.4. Examens microscopiques .....	26
II.4.1. Coloration de Gram .....	26
II.4.2. Examen de la mobilité .....	26
II.5. Conservation des souches .....	26
<b>III. Caractérisation phénotypique des isolats</b> .....	27
III.1. Tests nutritionnels .....	27
III.1.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone .....	27
III.2. Test physiologique .....	27
III.2.1. Effet de la température .....	27
III.2.2. Tolérance au pH .....	27
III.3. Tests biochimiques .....	28
III.3.1. Réduction des nitrates .....	28
III.3.2. Activité pectinolytique .....	28
III.3.3. Activité cellulolytique .....	28
III.4. Résistance aux métaux lourds .....	28

## **Chapitre III: Résultats et discussion**

<b>I. Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats</b> .....	29
I. 1. Isolement et identification .....	29
I. 2. Aspect des colonies .....	30
I. 3. Croissance sur les différents milieux de cultures .....	31
I. 4. Vitesse de croissance .....	32
I. 5. Examen microscopique .....	33
I.5.1. Coloration de Gram .....	33
I.5.2. Examen de la mobilité .....	34
<b>II. Caractérisation phénotypique des isolats</b> .....	35
II. 1. Test nutritionnel .....	35
II. 1. 1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone .....	35
II. 2. Test physiologique .....	36
II. 2. 1. Effet de la température .....	36
II. 2. 2. Tolérance au pH .....	38
II. 3. Tests biochimiques .....	38
II. 3. 1. Réduction des nitrates .....	38
II. 3. 2. Activité pectinolytique .....	39
II. 3. 3. Activité cellulolytique .....	40
II.4. Résistance aux métaux lourds .....	41

### **Conclusion et perspective**

### **Références bibliographique**

### **Annexe**

### **Résumé**

**Liste des figures**

N°	Titres des figures	Page
01	<i>Astragalus mareoticus</i>	10
02	Formation d'un nodule	12
03	Structure du nodule	13
04	Cycle de l'azote	15
05	Représentation du complexes nitrogénase	16
06	Réactions catalysées par la nitrogénase dans les bactéroïdes	17
07	Localisation de la région de prélèvement	21
08	<i>Astragalus mareoticus</i> . <b>(a), (b)</b>	22
09	rinçage des racines	23
10	Conservation des nodules	23
11	séparation et écrasement des nodules	24
12	l'ensemencement sur les différents milieux	25
13	tubes de Mannitol mobilité	26
14	conservation des isolats dans milieu TY incliné	27
15	Aspect des colonies sur <b>YMA</b> (isolat <b>K1</b> )	30
16	aspect des colonies sur <b>YMA</b> incline (isolat <b>K1</b> ) .	30
17	aspect des colonies sur milieu <b>YMA-RC</b> (isolat <b>K9</b> ).	32
18	aspect des colonies sur milieu <b>GPA-BCP</b> (isolat <b>K1</b> )	32
19	aspect des colonies sur milieu <b>YMA-BTB</b> (isolat <b>K 20</b> )	33
20	coloration de Gram (isolat <b>K11</b> ).	34
21	examen de mobilité	34
22	utilisation des sucres comme seule source de carbone.	35
23	effet de la température (isolat <b>K 7</b> )	37
24	tolérance au pH.	38
25	réduction de nitrate (résultat positive).	39
26	activité pectinolytique (résultat positive).	40
27	activité cellulolytique (résultat négative).	41



**Liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre des Tableau</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	classification des <i>Rhizobia</i> .	04
<b>02</b>	effets de l'environnement sur la physiologie des nodules fixant l'azote	18
<b>03</b>	Isolats et souches de référence utilisées	29
<b>04</b>	Croissance des souches sur les different milieux.	31
<b>05</b>	Effet de température.	36
<b>06</b>	Résultats des tests biochimique.	39
<b>07</b>	<b>La CMI</b> ( $\mu\text{g/ml}$ ) des isolats en présence de différents métaux lourds	42

**Liste des abréviations**

<b>A</b>	<i>Astragalus</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénine Diphosphate
<b>ARN</b>	Acide ribonucleique
<b>ATP</b>	Adenine triphosphate
<b>BcP</b>	Pourpre de Bromocrésol
<b>B.N.L</b>	Bactéries Nodulant Légumineuses
<b>BTB</b>	Bleu de Bromothymol
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de Calcium
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonate de Calcium
<b>CMC</b>	carboxy-methyl-cellulose
<b>Co<sup>2+</sup></b>	Cobalt
<b>DO</b>	densité optique
<i>fix</i>	Les gènes de la fixation de N <sub>2</sub>
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Fer
<b>GPA</b>	Glucose Peptone Agar
<b>Gram (-)</b>	Gram négative
<b>GPA</b>	Glucose Peptone Agar
<b>H<sub>2</sub></b>	gaz d'Hydrogène.
<b>H<sub>2</sub>O</b>	l'eau
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	chlorure de mercure
<i>hsn</i>	host specific nodulation
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrate de potassium
<b>Mg</b>	Magnésium.
<b>MoFe</b>	Molybdène de Fer
<b>Mo</b>	Molybdène
<b>nif</b>	gènes de structure que code pour la protéine dinitrogénase
<b>Nod D</b>	facteur de nodulation
<b>nod D</b>	gène de nodulation
<b>N<sub>2</sub></b>	diazote

<b>N</b>	L'azote
<b>N<sub>2</sub>O</b>	oxyde d'azote
<b>NaCl</b>	Chlorure de Sodium
<b>NH<sub>3</sub></b>	L'ammoniac
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	ion d'ammonium
<b>nif</b>	les gènes codent pour la nitrogénase réductase
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrates
<b>nod</b>	le gène de nodulation.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>Pb</b>	acétate de plomb
<b>PHB</b>	Polyhydroxybutyrate
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>RC</b>	Rouge Congo
<b>Sym</b>	plasmide de symbiose
<b>T°</b>	Température
<b>TY</b>	Tryptone Yeast
<b>YMA</b>	Yeast Mannitol Agar
<b>YMB</b>	Yeast Mannitol Agar
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de Zinc

# *Introduction*

### Introduction

Les légumineuses constituent une des plus grandes familles des plantes, adaptées à différentes situations pédoclimatiques (aridité, salinité...) (**Franco et de Faria, 1997**).

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire Algérien (Alimentation humaine et animale), grâce à leur richesse en protéines. L'une des principales caractéristiques des membres de la famille des *Fabaceae* est leur capacité à établir une association symbiotique avec des bactéries du sol de type rhizobia (**Domergue, 2006**).

Le genre *Astragalus L* fait partie des légumineuses, il est composé d'un grand nombre d'espèces, présenté par des plantes fleurissantes, la plupart du temps pérennes.

Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L), comprenant notamment les espèces du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Bien que de nombreuses études aient été entreprises sur ces bactéries en raison de leur intérêt agronomique.

Lors de cette symbiose, les B.N.L induisent sur les racines, et parfois sur les tiges, la formation du nodule chez le partenaire végétal, au sein desquelles elle trouve les conditions physiologiques nécessaires à la fixation et convertir de l'azote atmosphérique en ammonium, ce dernier est utilisé par la plante hôte. En retour elle procure à la bactérie des composés carbonés nécessaires à sa croissance. La fixation symbiotique joue donc un rôle important dans le cycle de l'azote et dans l'écosystème tout entier puisqu'elle constitue la plus grande source d'azote combiné produit dans la nature (**Dreyfus, 1982**).

En effet, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment et de manière autonome et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries (**Kneip et al., 2007**).

L'objectif de notre étude est la caractérisation phénotypique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse de genre *Astragalus* (particulièrement *Astragalus mareoticus*) dans la région de Fontaine des gazelles, willaya de Biskra.

Ce travail comprend trois principaux chapitres :

- Chapitre I : revue bibliographique, ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique.
- Chapitre II : matériel et méthodes, comprend les travaux réalisés en pratique.
- Chapitre III : résultats et discussion.

*Chapitre I :*

*Revue  
bibliographique*

## I. Établissement des symbioses rhizobiennes

### I.1. Les B.N.L

#### I.1.1. Le genre *Rhizobium*

Les *Rhizobium* furent isolés par **Beijerinck** en **1888** et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est **Franck** le premier qui a proposé le nom de *Rhizobium* en **1889**.

C'est une bactérie collectivement connue comme rhizobia ; elle est capable d'établir des associations symbiotiques avec beaucoup de légumineuses et quelques espèces non légumineuses. Le trait le plus important est leur capacité de former des nodules sur les racines (ou parfois sur la tige) dans lesquelles la fixation d'azote atmosphérique ( $N_2$ ) a lieu (**Pelmont, 1995**).

#### I.1.2. Caractères généraux

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatives, strictement aérobies, possédant une forme des bâtonnets de 0,6 à 0,9  $\mu m$  de largeur et de 1,2 à 3  $\mu m$  de longueur et non sporulant (**Jordan, 1984**). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (**Werner, 1992**).

Les espèces de *Rhizobium* en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (**Somasegaran et Hoben, 1994**). En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobia et le *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  et  $Co^{2+}$ , leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate (**Werner, 1992**).

#### I.1.3. La nutrition azotée des *Rhizobium*

Les *Rhizobium* peuvent assimiler un large spectre de formes organiques ou minérales d'azote et il existe une relative diversité au sein des souches d'une même espèce quant à leurs préférences, particulièrement chez les bactéries à croissance lente (**Lakhal, 2011**).

- L'urée peut être assimilée par toutes les espèces du genre *Rhizobium* (**Jensen et Schroeder, 1965**).

- Parmi la grande variété d'acides aminés utilisés, le glutamate est le plus adéquat, **Rigaud, (1965)**; **Elkan et Kurik, (1968)** constatent que les autres acides aminés largement utilisés à travers les différentes espèces sont l'aspartate, la proline et l'histidine, alors que **Tan et Broughton (1981)** ajoutent que l'ammonium est utilisé par tous les *Rhizobium*.

- Pour **Elkan, (1967)** l'hydrolysate de caséine dépourvu de vitamines, est la meilleure source

d'azote pour des souches de *Bradyrhizobium japonicum* et qu'aucune combinaison d'acides aminés ne parvient à le remplacer.

- Alors que **Vincent, (1977)** constate que la peptone constitue une très mauvaise source d'azote à l'exception pour certains *Rhizobium*.

- L'extrait de levure est la source d'azote fournie habituellement au *Rhizobium*, sa capacité à stimuler la croissance de nombreuses souches résulte autant de l'apport de substrats azotés assimilables que de divers composés qu'il contient (vitamines, facteurs de croissance, micro éléments) (**Urban, 1979; Chakrabarti et al., 1981**).

Dans le cas de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, la fixation de l'azote atmosphérique s'effectue au niveau de la Rhizosphère : volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes qui se caractérise par des compositions chimiques et biologiques très différentes de celles du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines (**Alami et al., 1999**) et par la présence des exsudats racinaires (**Moenne-locco Yvan et al., 2005**).

#### I.1.4. Taxonomie des B.N.L

Selon le Bergey's Manuel (**Jordan, 1984**) les rhizobia appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des *Gracilicutes*, au domaine des *Bacteria*, à l'embranchement des *Proteobacteria*, à la classe Alpha, à l'ordre *Rhizobiales* et à la famille *Rhizobiaceae*.

Le **tableau 1** présent une nouvelle taxonomie des rhizobia décrit par **Berrada et Fikri-Benbrahim (2014)**.

#### ➤ Méthodes utilisées pour la taxonomie du rhizobia

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), la classification bactérienne actuelle repose sur une approche polyphasique portant sur la convergence du maximum de données d'ordre phénotypique, génotypique et phylogénétiques. L'information génotypique est fournie par les acides nucléiques (ADN et ARN) présents dans les cellules, tandis que l'information phénotypique est donnée par les protéines et leurs fonctions, par différents marqueurs chimiotaxonomiques et plusieurs autres caractères exprimés (**Vandamme et al., 1996**).

Les études phylogénétiques sont basées sur l'étude de gènes qualifiés d'horloges moléculaires universelles ; ce sont des gènes ubiquistes, très conservés et de fonction identique qui accumulent régulièrement des mutations au cours du temps, tels les ADNs ribosomiques (**Woese 1987**).



Tableau 01: classification des rhizobia (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

Genus species	Isolation source
<b>Class: Alphaproteobacteria</b>	
<b>Order: Rhizobiales</b>	
<b>Family: Rhizobiaceae</b>	
<b>Genus: Rhizobium</b>	
<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. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>
<i>R. radiobacter</i>	*

<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*
<b>Genus: Ensifer</b>	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>E. terangaie</i>	Different host plants
<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i> )	<i>Glycine max</i>
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>
<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>
<b>Genus: Shinella</b>	
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
<b>Family: Phyllobacteriaceae</b>	
<b>Genus: Mesorhizobium</b>	
<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. plurifarum</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis,</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. thioganicum</i>	*
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>
<i>M. gobiense</i>	Wild legumes
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<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. abvssinicae</i>	Different arborescent legume trees

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

<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</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</i> spp.
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<b>Genus: Cupriavidus</b>	<i>Aspalatus carnosus</i>
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i> sp.
<b>Class: Gamma-Proteobacteria</b>	
<b>Order: Pseudomonadales</b>	
<b>Family: Pseudomonaceae</b>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Robinia pseudoacacia</i>

## I.2. La plante hôte

### I.2.1. Famille de plante-hôtes impliquées dans la symbiose : les légumineuses

Les plantes de la famille des légumineuses sont très nombreuses (entre 16000 et 19000 espèces), elles comprennent des espèces annuelles et ligneuses qui colonisent des écosystèmes variés allant des régions circumboréales jusqu'à l'équateur. Toutes les espèces appartenant aux légumineuses ne sont pas nodulées. Environ 20%, des *Papilionoideae* (soit 3400) ont été testées pour leur aptitude à noduler. Le pourcentage des familles examinées capables de nodules se répartit de la façon suivante : *Papilionoideae* (97%), *Mimosoideae* (90%) et *Caesalpinioideae* (23%) (Douhoux et Nicole, 2004)

Les légumineuses sont des angiospermes cosmopolites, arborescentes ou fabacées, très diversement constituées, mais presque toujours à feuilles pennées, alternées et stipulées. Les fleurs sont habituellement en grappes.

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne,...) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène) (Lazrek-Ben Friha, 2008).

### I.2.2. Classification des légumineuses

Les légumineuses constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, constituent un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié.

Dans la classification des légumineuses, il apparaît les trois sous-familles (Come et al., 2006) :

- Sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papillonacée ;
- Sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière;
- Sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon.

Chez les légumineuses, les genres les plus importants seraient *Medicago*, *Trifolium*, *Onobrychis*, *Hédysarum*, *Astragalus* et *Lotus* (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004).

### I.2.3. La légumineuse étudiée: Astragales

Le genre *Astragalus* est largement représenté au niveau du bassin Méditerranéen, plusieurs espèces d'intérêt différent poussent dans différents milieux. Certains taxon, par leur morphologie (épineuse), et d'autres par leur toxicité arrivent à se maintenir dans les parcours soumis au surpâturage. Autre l'intérêt pastoral de certains taxons, les espèces de ce genre peuvent être une source de gènes d'adaptation à certains milieux (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004). Il est représenté dans le monde par près de deux milles espèces localisées dans l'hémisphère Nord du globe terrestre et dans la cordillère des andes. Dans les pays du bassin Méditerranéen cinq cents espèces ont été décrites dont une cinquantaine en Afrique du Nord. Au Sahara Algéro-Marocain, une quinzaine d'espèces ont été identifiées (Benarous, 2006).

### I.2.4. Principales Astragales répertoriées

Les différentes recherches sur les références démontrent qu'il existe plusieurs espèces d'*astragalus* :

<i>Astragalus aberrans</i> Förther & Podlech	<i>Astragalus akkensis</i> Coss.
<i>Astragalus algarbiensis</i> Bunge	<i>Astragalus algerianus</i> E.Sheld.
<i>Astragalus alopecuroides</i> L.	<i>Astragalus annularis</i> Forssk.
<i>Astragalus antiatlanticus</i> Emb. & Maire	<i>Astragalus armatus</i> Willd.
<i>Astragalus bisulcatus</i> (Hook.) A.Gray	<i>Astragalus boeticus</i> L.
<i>Astragalus bombycinus</i> Boiss.	<i>Astragalus bourgaeanus</i> Coss.
<i>Astragalus caprinus</i> L.	<i>Astragalus chlorocyaneus</i> Boiss. & Reut.
<i>Astragalus corrugatus</i> Bertol.	<i>Astragalus crenatus</i> Schult.
<i>Astragalus cymbaearpos</i> Brot.	<i>Astragalus depressus</i> L.
<i>Astragalus dolinicolus</i> Ghahrem.-Nejad	<i>Astragalus echinatus</i> Murray

<i>Astragalus eremophilus</i> Boiss.	<i>Astragalus falciformis</i> Desf.
<i>Astragalus fatmensis</i> Hochst. ex Chiov.	<i>Astragalus faurei</i> Maire
<i>Astragalus fontqueri</i> Maire & Sennen	<i>Astragalus froedinii</i> Murb.
<i>Astragalus fruticosus</i> Forssk.	<i>Astragalus geniculatus</i> Desf.
<i>Astragalus glaux</i> L.	<i>Astragalus gombo</i> Bunge
<i>Astragalus graecus</i> Boiss. & Spruner	<i>Astragalus granatensis</i> Lam.
<i>Astragalus gryphus</i> Bunge	<i>Astragalus hamosus</i> L.
<i>Astragalus hauarensis</i> Boiss.	<i>Astragalus hispidulus</i> DC.
<i>Astragalus ibrahimianus</i> Maire	<i>Astragalus incanus</i> L.
<i>Astragalus intercedens</i> Rchb.f.	<i>Astragalus kahiricus</i> DC.
<i>Astragalus kralikii</i> Batt.	<i>Astragalus leptocephalus</i> Batt.
<i>Astragalus longicaulis</i> Pomel	<i>Astragalus longidentatus</i> Chater
<i>Astragalus macrocarpus</i> DC.	<i>Astragalus maireanus</i> Greuter & Burdet
<b><i>Astragalus mareoticus</i> Delile</b>	<i>Astragalus maroccanus</i> Braun-Blanq. & Maire
<i>Astragalus maurorum</i> Murb.	<i>Astragalus maurus</i> (Humbert & Maire) Pau
<i>Astragalus monspessulanus</i> L.	<i>Astragalus narbonensis</i> Gouan
<i>Astragalus onobrychis</i> L.	<i>Astragalus peregrinus</i> Vahl
<i>Astragalus praetermissus</i> Ball	<i>Astragalus pseudosinaicus</i> Gazer & Podlech
<i>Astragalus reesei</i> Maire	<i>Astragalus reinii</i> Ball
<i>Astragalus saharae</i> Pomel	<i>Astragalus schimperi</i> Boiss.
<i>Astragalus schizotropis</i> Murb.	<i>Astragalus scorpioides</i> Willd.
<i>Astragalus sesameus</i> L.	<i>Astragalus sieberi</i> DC.
<i>Astragalus solandri</i> Lowe	<i>Astragalus spinosus</i> (Forssk.) Muschl.
<i>Astragalus stella</i> Gouan	<i>Astragalus taubertianus</i> E.A.Durand & Barratte
<i>Astragalus tetuanensis</i> Podlech	<i>Astragalus tragacantha</i> L.
<i>Astragalus tribuloides</i> Delile	<i>Astragalus trigonus</i> DC.
<i>Astragalus trimestris</i> L.	<i>Astragalus turolensis</i> Pau
<i>Astragalus vogelii</i> (Webb) Bornm	

### I.2.5. Intérêt médicinal du genre

L'Astragale est natif 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 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. Après la recherche sur les références

démontrent que :

- Les propriétés immunitaires de cette plante semblent ramener à un niveau normal le nombre de cellules T (un globule blanc de la famille des lymphocytes) dans les cas de certains cancers ;
- Les recherches en laboratoire sur certains extraits de la racine ont démontré un effet protecteur au niveau des cellules hépatiques soumises à certains toxiques. Un effet anti-inflammatoire a également été constaté ;
- L'Astragale contient également un flavonoïde nommé astragaline, qui est un puissant antioxydant (Saoudi, 2008).

### I.2.6. *Astragalus mareoticus*

#### I.2.6.1. Description

Elle est décrite par **Quezel et Senta** en **1962** comme espèce de gousses fortement arquées, semi annulaires ou annulaires, hispides de poils courts raides et apprimés, Fleurs violet pâle, Feuilles à 5-8 paires de folioles. (Figure 01)

#### I.2.6.2. Habitat

On le trouve dans les sols sableux et vaseux, des jardins (dans le désert, semi-désertique et la zone de steppe), dans les îles Canaries, l'Arabie saoudite, le Maroc, l'Algérie, la Libye et l'Egypte (Site 1).



**Figure 01 : *Astragalus mareoticus* (Photos original).**

## II. L'infection et la nodulation

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation des nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection (Anonyme, 2014).

### II.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 par exemple dans haricots de *Phaseolus* ou, plus habituellement, aux positions dans l'infection filète où la paroi des cellules devient abrupte et les cellules bactériennes entrent en contact direct avec la membrane de plasma de centre-cellule. Les bactéroïdes mûrs de membrane de cellules de la plante continuent à accumuler de grandes quantités de polyhydroxybutyrate ou (PHB) (Juergen Prell et al., 2006).

### II.2. Etapes de nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Fitouri, 2011).

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre étapes majeures : la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Figure 02) (Sanchez et al, 1991).

#### II.2.1. Phase de pré-infection

Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre de bactéries au niveau de la racine. (Richter., 1993).

Les légumineuses stimulent les *Rhizobium* dans leur rhizosphère par sécrétion de flavonoïdes qui activent les facteurs Nod déclenchant ainsi la transcription des gènes de nodulation. Il s'ensuit que le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi. La déformation des poils absorbants de la plante est due à l'action d'auxines végétales (Hopkins., 1999).

#### II.2.2. Phase de l'infection et de la formation des nodules

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme de lors, dans le poil absorbant, 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**).

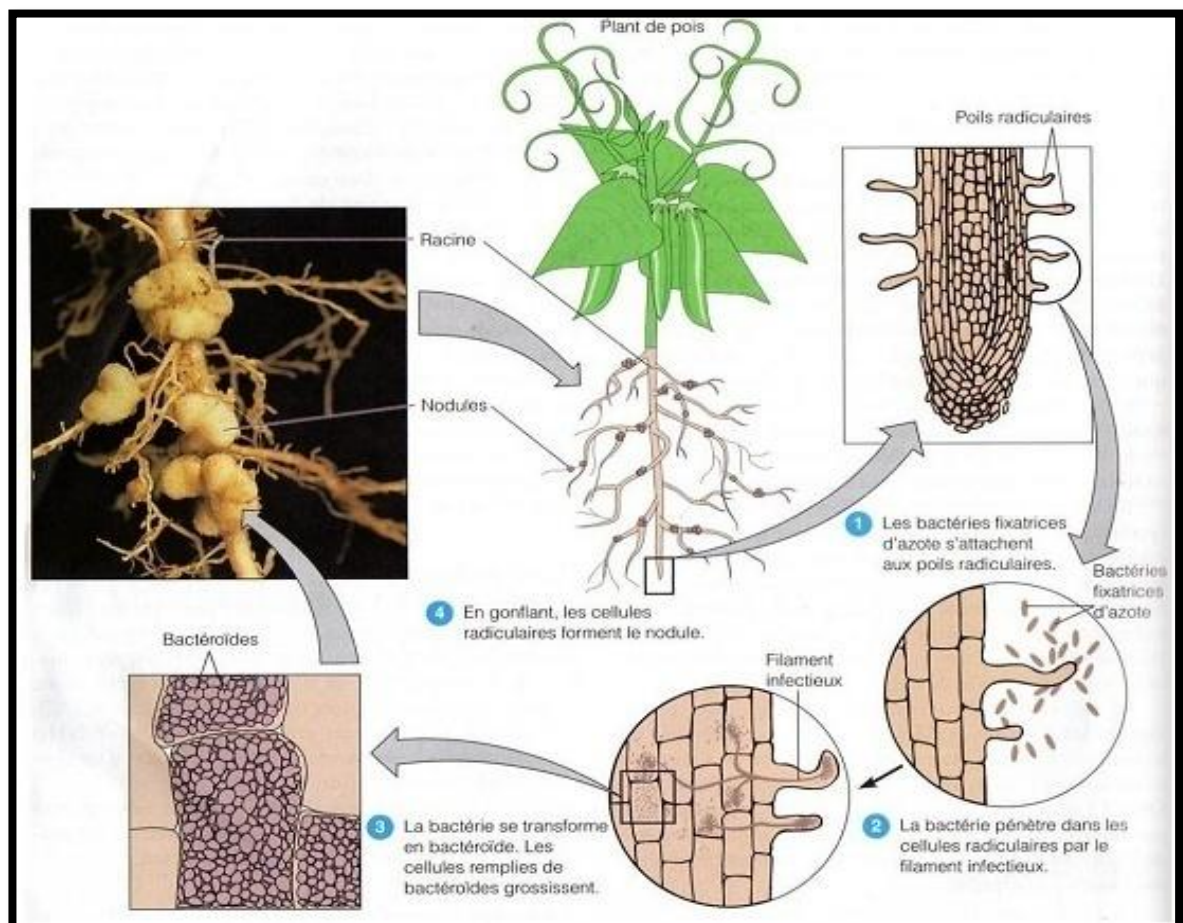
### II.2.3. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules

Les nodosités se forment par multiplication des cellules infectées. Les *Rhizobium* prennent la forme bactéroïde, entourés par une membrane pér bactéroidienne, après leur libération du cordon d'infection (**Hopkins., 1999**).

La membrane pér bactéroidienne a pour rôle de la stabilité du système hôte/symbiose ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte (**Richter., 1993**).

### II.2.4. Phase de dégénérescence

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



**Figure 02:** formation d'un nodule (**Tortora et al., 2003**).

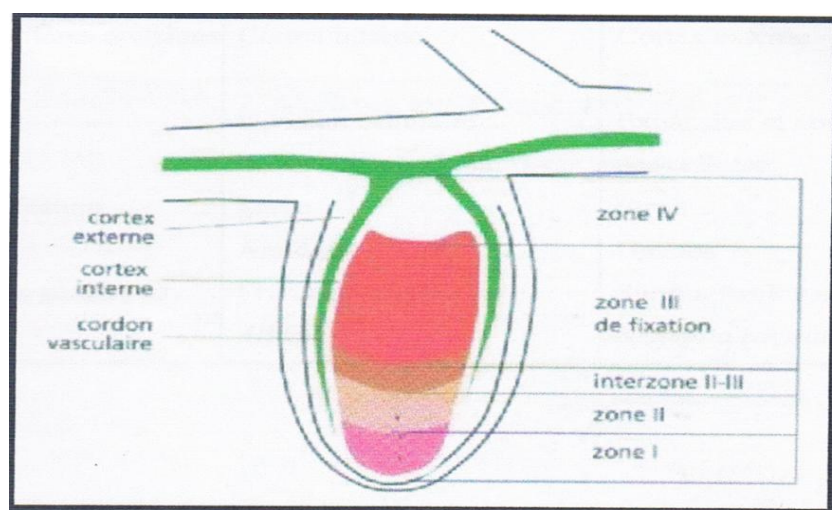
### II.3. Structure des nodules

L'infection du nodule indéterminé se fait par sa base, ce qui établit un gradient de différenciation et définit plusieurs zones (**Figure 03**) :

- La **zone méristématique** (zone I) située à l'apex. Cette zone est toujours dépourvue de bactéries.
- 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 rhizobiennes. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroidienne, et leur différenciation en bactéroides commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.
- L'interzone II-III dans laquelle la différenciation des bactéroides se poursuit et la fixation de l'azote commence.
- La **zone de fixation** (zone III) où les bactéroides pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- La **zone 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 d'une à trois couches de cellules.
- Le parenchyme central qui contient les cellules infectées et des cellules non infectées.



**Figure 03** : Structure du nodule (Duhoux et Nicole, 2004)

## II.4. Processus de fixation de l'azote

L'azote est un des éléments majeurs de la matière vivante, végétale et animale. Les plantes en particulier, puisent dans le sol, l'azote combiné nécessaire à leur croissance alors que leurs feuilles sont directement en contact avec l'air qui contient en volume 79% d'azote moléculaire ( $N_2$ ). Ce dernier constitue la principale réserve naturelle d'azote pour la biosphère mais il n'est pas assimilable par la plupart des êtres vivants (**Zakhia, 2001**).

Les plantes supérieures ne fixent pas l'azote atmosphérique (**Guignard, 2000**). Les organismes qui fixent l'azote atmosphérique sont tous des micro-organismes telluriques, *Bactéries*, *Cyanobactéries* et quelques *Mycètes lévuriformes*. Ce rôle des micro-organismes est connu depuis le XIX<sup>e</sup> siècle (**Tourte et al., 2005**). On appelle fixation de l'azote le processus par lequel ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac (**Tortora et al., 2003**). La fixation de  $N_2$  est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (**Roger et al., 1996**).

### II.4.1. Cycle de l'azote

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

Les trois principales étapes de ce cycle sont : l'ammonification, la nitrification et l'assimilation (**Raven et al., 2007**) (**Figure 04**).

### II.4.2. Fixation biologiques d'azote

La fixation biologique de  $N_2$  est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an (**Roger et al., 1996**). Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée (**Hopkins, 2003**). La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue le principal mécanisme d'incorporation d'azote fixé dans la biosphère (**Svistoonoff, 2003**).

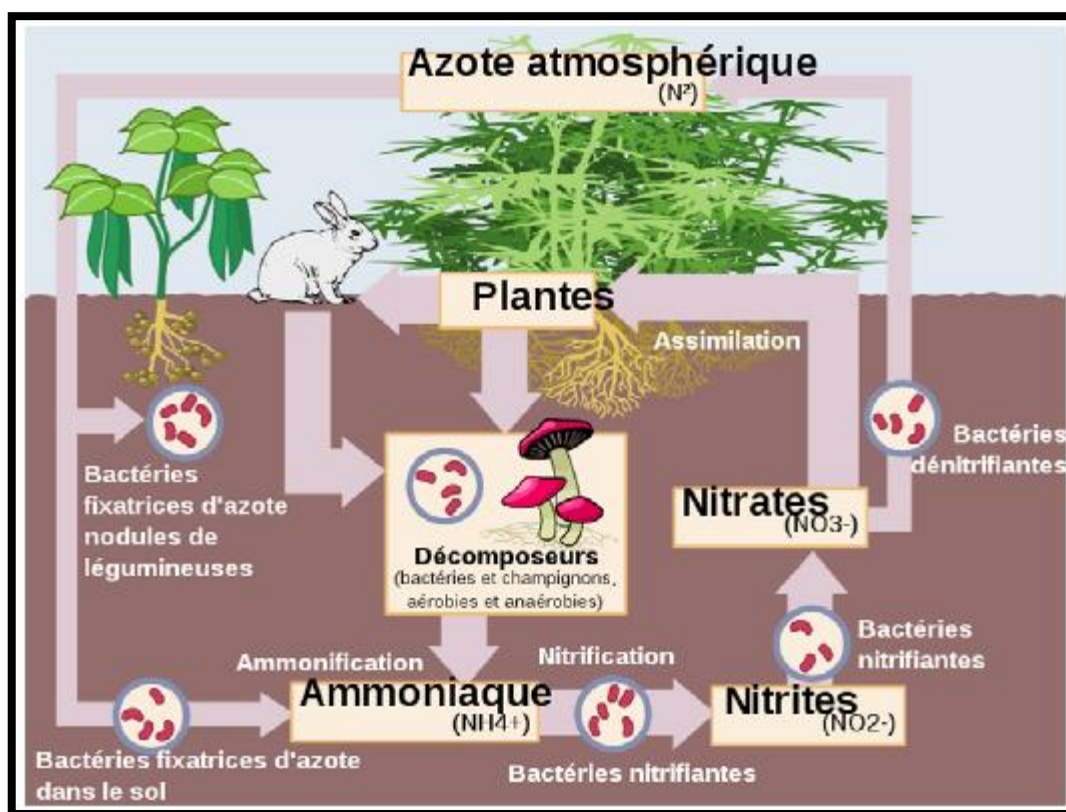


Figure 04: Cycle de l'azote (Péret, 2007).

#### II.4.2.1. Fixateurs libres

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

#### II.4.2.2. Fixateurs symbiotiques

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

Les espèces fixatrices d'azote réellement, symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les *Rhizobium*, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (Pelmont, 1995). Les bactéries de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (Tortora *et al.*, 2003). Mais la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant des bactéries du sol, les *Rhizobium*, aux légumineuses (Dénarié, 2000).

### II.4.3. Molécules clé de la fixation d'azote

#### II.4.3.1. Le complexe nitrogénase

La fixation de l'azote est catalysée par un complexe enzymatique nommé nitrogénase ou dinitrogénase (Hopkins, 2003), responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac (Dénarié, 2000). La nitrogénase a été purifiée chez pratiquement tous les procaryotes fixateurs d'azote connus (Hopkins, 2003). C'est un complexe protéique multimérique composé de deux protéines de taille différente (Leclerc, 1995 ; Broughton *et al*, 2000 et Hopkins, 2003) :

- a. **Une réductase** : qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du Fer.
- b. **Une nitrogénase** : appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramérique), reliés entre eux deux par deux, ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire  $N_2$  en  $NH_3$  (Figure 05).

Le transfert des électrons de la réductase à la nitrogénase est couplé à l'hydrolyse de l'ATP par la réductase (Broughton, 2000).

Une remarquable conservation des séquences de nucléotides des gènes de structure de cette enzyme a pu être mise en évidence chez toutes les bactéries fixatrices étudiées (Davet, 1996).

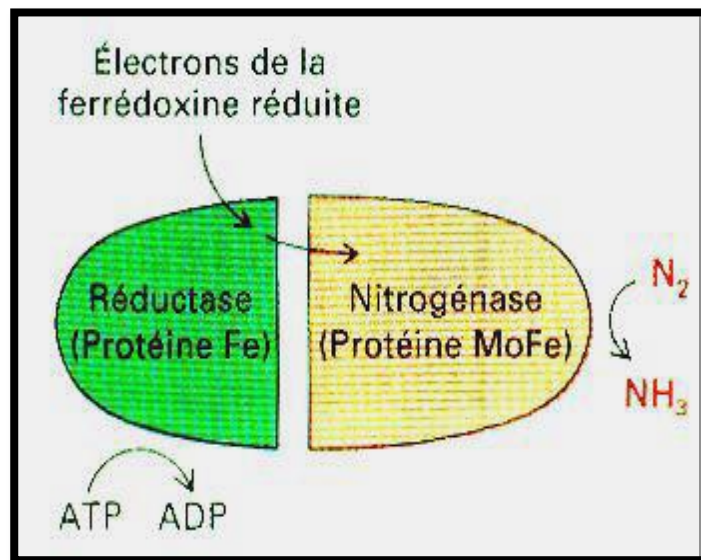


Figure 05 : Représentation du complexe nitrogénase (Sebihi, 2008).

#### II.4.3.2. La leghémoglobine

C'est une chromoprotéine formée de deux sous unités, de structure comparable aux globines de l'hémoglobine ou de myoglobine (Hopkins, 2003; Tourte *et al.*, 2005). Synthétisée par la plante hôte, est localisée dans les cellules hôte infectées par les bactéroïdes. (Hopkins, 2003). La synthèse

de leghémoglobine dépend d'information génétique apportée par la plante et la bactérie, aucun des deux partenaires n'étant capable de la produire indépendamment de l'autre (Perry *et al.*, 2004).

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

**II.4.4. La réaction globale de la fixation de l'azote**

La réaction chimique connue sous le nom de fixation biologique de l'azote prend place dans les nodules. Bien que le processus implique un grand nombre de réactions biochimiques, il peut être résumé en une simple réaction (Figure 06).

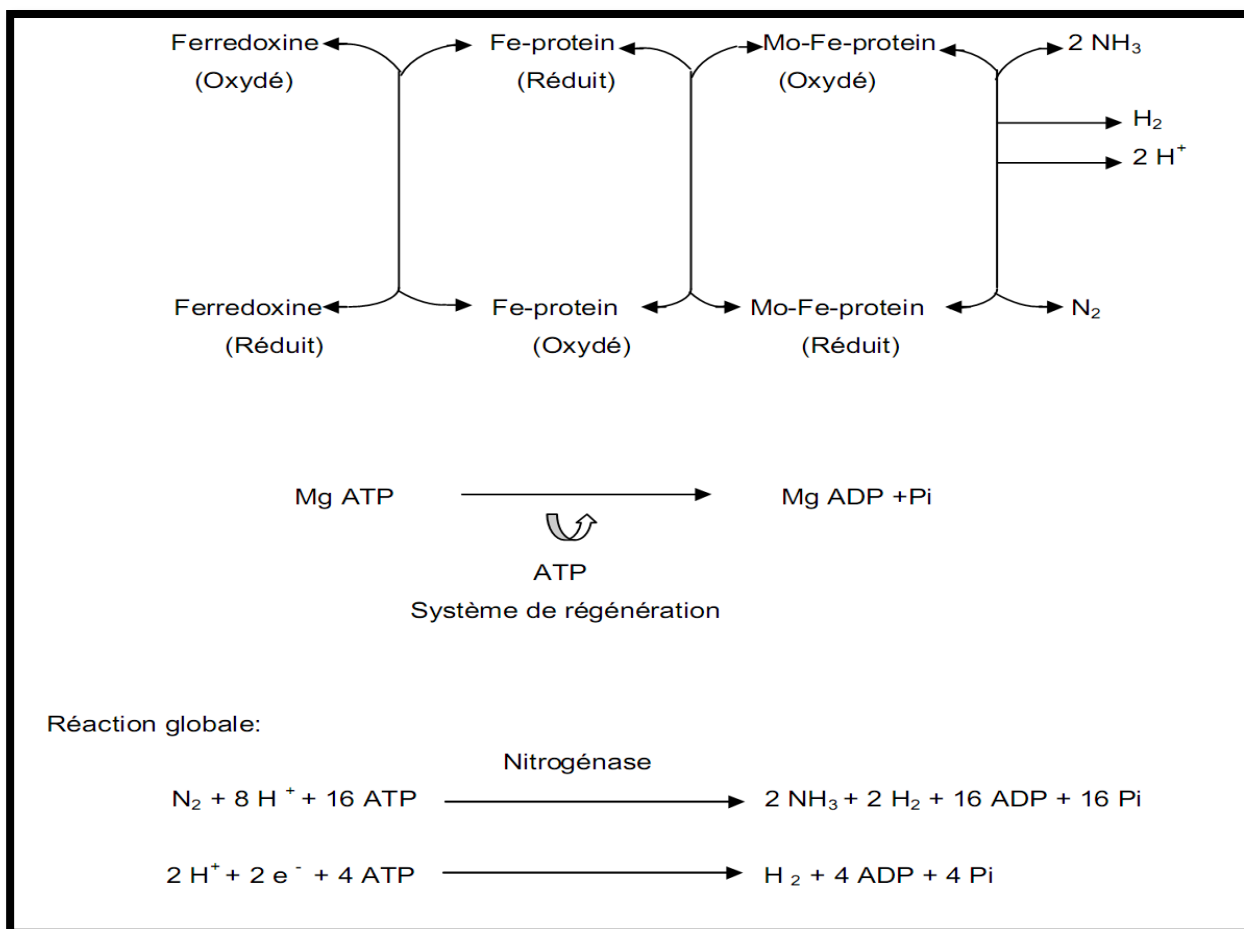


Figure 06: Réactions catalysées par la nitrogénase dans les bactéroïdes (Sprent, 1984)

**II.4.5. Contraintes environnementales liées à la fixation**

Le processus de fixation de l'azote est influencé par plusieurs facteurs, le tableau suivant présente quelques facteurs.

Tableau 2 : effets de l'environnement sur la physiologie des nodules fixant l'azote (Sprent, 1984)

facteur	Effets
Température	Sur la fixation de l'azote et/ou son assimilation. diffusion des gaz
Stress hydrique	effet direct sur les nodules incluant une réduction de la porosité affectant l'assimilation de l'O <sub>2</sub>
Salinité	réduction de l'activité de la nitrogénase l'inhibition de la synthèse de la leghémoglobine
L'azote combine	inhibition par les nitrites formes par la réduction des nitrates dans les bacteroides.

### III. Génétique de la symbiose, la nodulation et la fixation d'azote

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

#### III.1. Les flavonoïdes et la diversité des facteurs *Nod*

##### III.1.1. Les flavonoïdes

L'interaction symbiotique déclenchée sous la responsabilité du flavonoïde libéré par les racines des légumineuses et réorganisé par les facteurs *Nod* des rhizobia (Boukli, 2006). Différents composés phénoliques sont inducteurs des gènes *nod*, mais avec des efficacités variable selon leur concentration et leur structure chimique (Macheix *et al.*, 2005).

##### III.1.2. Les facteurs *Nod*

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

L'identification du signal *Nod*, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux *Nod*, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs *Nod* sont des molécules lipo-chitoooligosaccharidiques (Terefework, 2002). Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires (Debellé *et al.*, 2001).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nodABCD* codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs *Nod*, et les gènes *hsn* pour les diverses substitutions des facteurs *Nod* (Debellé et al., 2001).

### III.2. Les gènes de nodulation

La capacité des rhizobia à former des nodules repose sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation indispensables à la symbiose. Les gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipo-chitooligosaccharide (Boivin-Masson et al., 2006).

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

#### III.2.1. Les gènes *nod* communs

Les gènes communs *nodA*, *nodB* et *nodC* sont des gènes clés de la nodulation car ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs *Nod* (Boivin-Masson et al., 2006). Sont des gènes dits communs car, rencontrés chez toutes les espèces de *Rhizobium* (Werner, 1992 ; Dénarié, 2000 ; Duhoux, 2004) .

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

#### III.2.2. Les gènes *hsn* : (host specific nodulation)

Sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (Pelmont, 1995), présents chez certaines espèces et non chez d'autres. Ils sont, de se fait, responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante (Davet, 1996).

#### III.2.3. Les gènes *nodD*

Gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoïdes (Pelmont, 1995).

### III.3. Aspects moléculaires de la fixation d'azote

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

#### III.3.1. Les gènes *nif*

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse d'un complexe enzymatique (nitrogénase) (Dénarié, 2000).



D'autres gènes *nif* sont impliqués dans l'insertion du cofacteur de la protéine MoFe ainsi que dans l'activation et l'assemblage du complexe enzymatique (**Pelmont, 1995; Hopkins, 2003**).

### **III.3.2. Les gènes *fix***

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotique et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (**Brewin, 1992 ; Hopkins, 2003**).

*Chapitre II :*

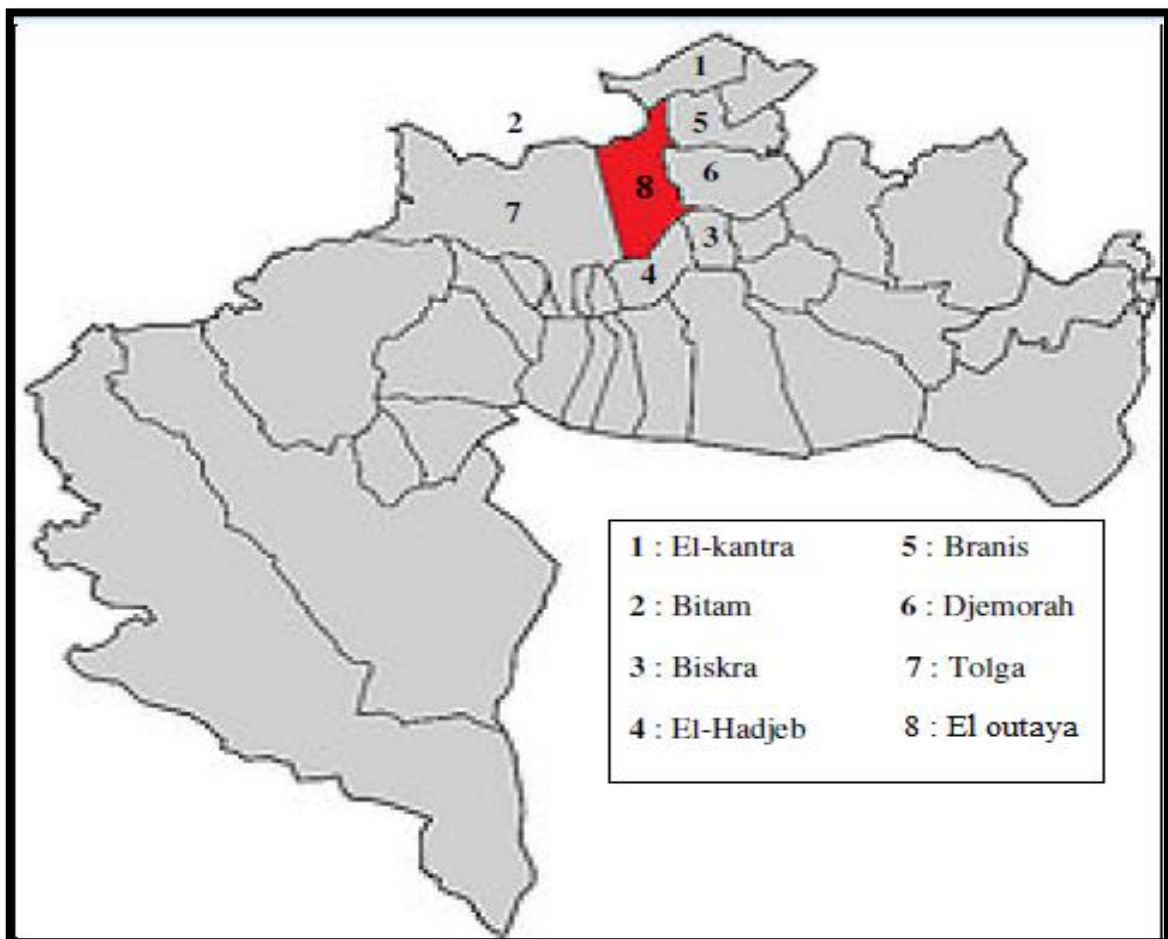
*Matériel et  
méthodes*

**I. Isolement des bactéries à partir des nodules**

**I.1. Présentation de la région d'étude**

La wilaya de Biskra est située au centre-est de l'Algérie, aux portes du Sahara algérien. Elle s'étend sur une superficie d'environ 21671 km<sup>2</sup> (Farhi, 2001). Elle est située entre le 4°15' et le 6°45' Est de longitude et entre le 35°15' et le 33°30' degré Nord de latitude. Son altitude varie entre 29 et 1600 mètres part rapport au niveau de la Méditerranée. Elle est limitée au nord par les wilayas de Batna et M'sila, au Sud par les wilayas d'Ouargla et El-Oued, à l'est par la wilaya de Khenchela et à l'ouest par la wilaya de Djelfa (Moussi, 2012).

Le site de l'échantillonnage est le Fontaine des Gazelles, à la Daïra d'El outaya, wilaya de Biskra. est limitée au Nord: des communes de Bitam (W de Batna) et El Kantara, au Sud: les communes d'El Hadjeb et Biskra, et à l'Est celle de Branis et Djemorah, alors qu'à l'Ouest la commune de Tolga (Figure 07).



**Figure 07 :** Localisation de la région de prélèvement (Site 2).

## I.2. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante *Astragalus mareoticus* située dans la région de Fontaine des gazelles, wilaya de Biskra, durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité, durant le mois de Mars et Avril quand 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

C'est une légumineuse endémique, de forme rampante, présentant de longues tiges étalées sur le sol et d'autres dressées (**Figure 08**).



**Figure 08 :** *Astragalus mareoticus*,. (a) : Photo « Sahara Nature » (Site 3). (b) : Espèce récoltée au site de Fontaine des gazelles, Biskra.

La collecte des nodules a été réalisé l'année passée par l'étudiant Achour H, 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, ainsi que cette année on à suivre les restes étapes.

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau (**Figure 09**), 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.



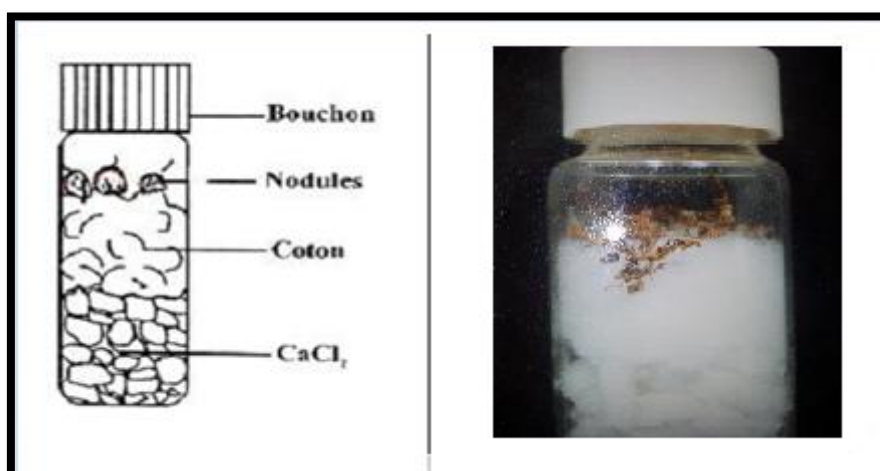
**Figure 09** : rinçage des racines (**Photo original**).

### 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.

Pour une conservation de longue durée il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) anhydre qui permet une longue conservation (6 à 12 mois) (**Vincent., 1970**).

La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre ; chacun est rempli au  $\frac{3}{4}$  de son volume, par du  $\text{CaCl}_2$  anhydre recouvert d'une couche de coton et est identifié par une étiquette de façon à mettre en évidence : Le nom de la légumineuse (genre et espèce), Le lieu de prélèvement, La date de prélèvement (**Figure 10**).



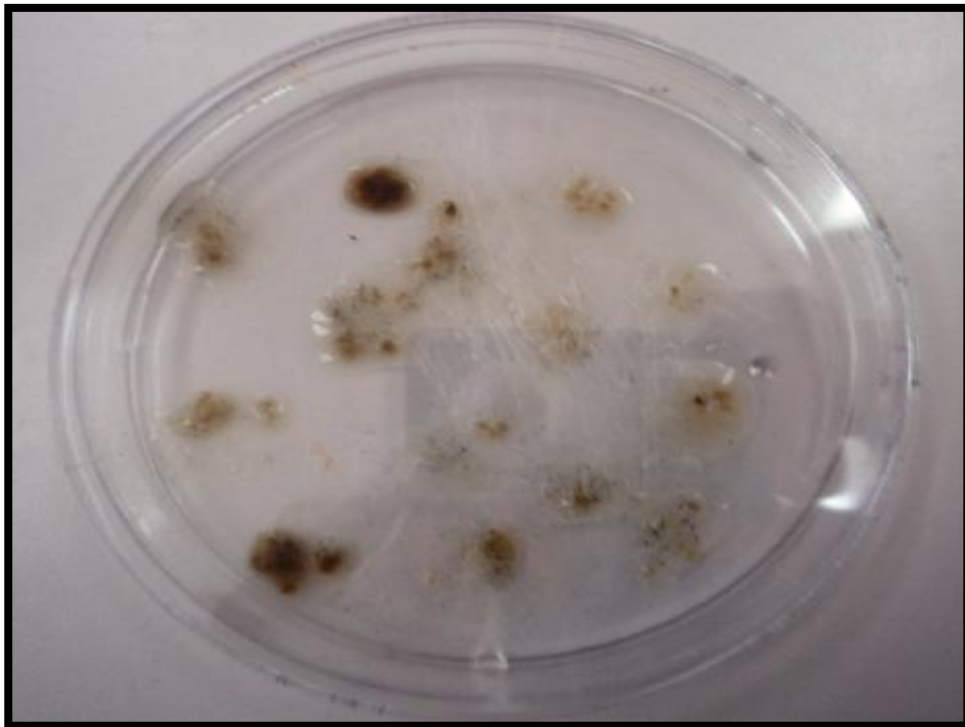
**Figure 10** : Conservation des nodules (**Photo original**).

**I.3. Stérilisation des nodules**

Puis que les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils seront auparavant mis dans l'eau au réfrigérateur toute une nuit. Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol, puis transférés dans l'eau de javel pendant 3 mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile, laissé gonfler après le 10<sup>ème</sup> rinçage.

**I.4. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés (Vincent, 1970).**

Dans une boîte de Pétri stérile, une goutte d'eau stérile est déposée. Les nodules stériles sont repartis séparément dans la goutte d'eau puis écrasés avec une pince stérile à bout émoussé (**Figure 11**).



**Figure 11** : séparation et écrasement des nodules (**Photo original**).

Le broyat obtenu à partir de chaque nodule écrasé sera ensemencé sur boîtes de Pétri coulé par différents milieux de culture utilisés (**Figure 12**), les boîtes de Pétri sont incubées 72 heures à 28 °C à l'étuve.

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

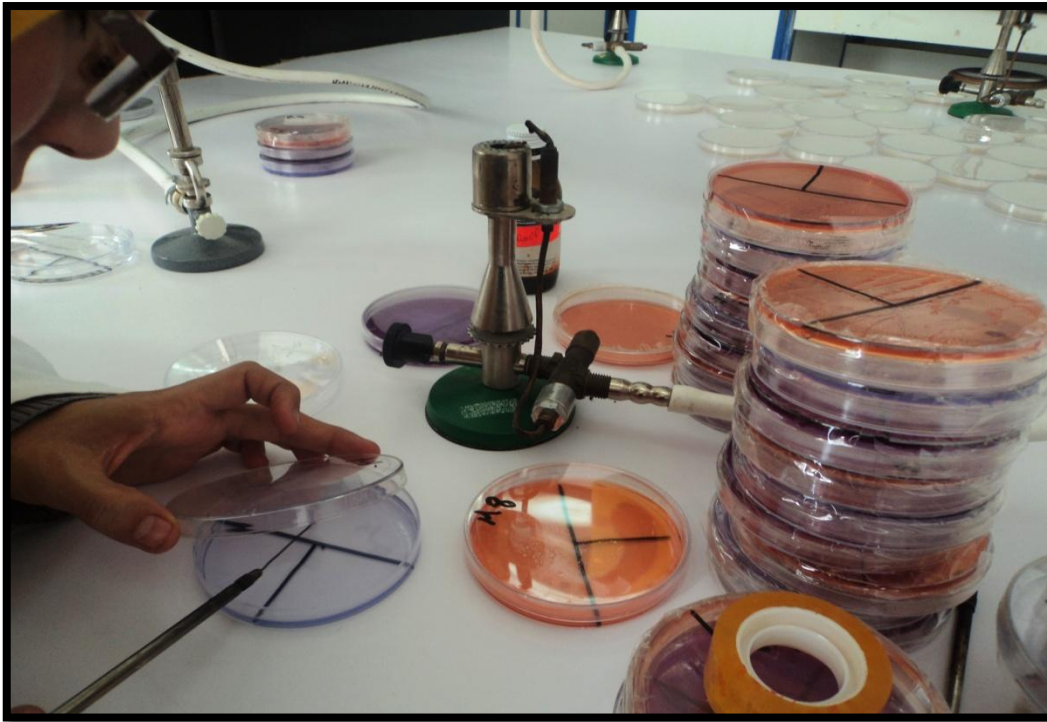


Figure 12 : l'ensemencement sur les différents milieux (Photo original)

## II. Purification et conservation des isolats

### II.1. Principaux milieux utilisés

On à utilisé plusieurs milieux qui sont: (Annexe 1)

Milieu liquide : **YMB** (yeast mannitol broth).

Milieux solides: **YMA** (yeast mannitol agar).

**YMA+RC** (yeast mannitol agar+ rouge Congo)

**YMA+BTB** (yeast mannitol agar+ blue de bromothymol)

**GPA+BCP** (Glucose peptone agar+ pourpre de bromocrésol).

### II.2. Purification des isolats

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

### II.3. Vitesse de croissance

Les colonies suspectées et retenues sont ensemencées sur milieu **YMA-BTB** permettant de distinguer les bactéries à croissance rapide et bactéries à croissance lente (Vincent, 1970; Jordan, 1984).

**II.4. Examens microscopiques****II.4.1. Coloration de Gram**

A partir des cultures **YMB** de chaque souche, on prépare des lames pour la coloration.

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

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

**II.4.2. Examen de la mobilité**

Par une anse de platine contient une suspension bactérienne de 24 heures, faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité (**Figure 13**). Incubé pendant 24h et observer.



**Figure 13 : tubes de Mannitol mobilité (Photo original).**

**II.5. Conservation des souches**

La technique de conservation utilisée est celle décrite par **Vincent (1970)**. Le milieu **YMA** est tamponné avec 3g /l de  $\text{CaCO}_3$  et réparti dans des tubes.



Après autoclavage à 120°C pendant 20 min, les tubes sont inclinés. Après refroidissement, des stries de la souche à conserver sont effectuées sur la surface de la gélose inclinée. La technique permet une conservation de 6 à 12 mois à 4° C (**Figure 14**).



**Figure 14 :** conservation des isolats dans milieu **TY** incliné (**Photo original**).

### **III. Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **III.1. Test nutritionnel**

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

Les souches sont cultivées sur milieu **TY** où l'extrait de levure a été réduit à 0.05g/l et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Galactose, Maltose, Saccharose, Glucose, Fructose. Incuber à 28°C dans l'étuve, puis mesurer la DO à 600nm.

#### **III.2. Tests physiologiques**

##### **III.2.1. Effet de la température**

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu **YMA** et incubées à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C et 37°C.

##### **III.2.2. Tolérance au pH**

Les souches sont cultivées sur le milieu **YMB** à différents pH : 5, 6, 6,8, 7,5, 8, en présence des témoins à pH 6,8. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 600 nm après 24 heures d'incubation.

### **III.3. Tests biochimiques**

#### **III.3.1. Réduction des nitrates**

Les souches sont cultivées sur **TY** contenant 0.1% de  $\text{KNO}_3$  (w/v). Après 4 jours d'incubation à 28°C, on dépose à la surface de la culture 3 à 4 gouttes des réactifs du nitrate réductase (**Guiraud, 1998**).

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

**Réactif II :**  $\alpha$  naphtylamine à 0.5% dans l'acide dilué au même temps.

#### **III.3.2. Activité pectinolytique**

Les souches en phase de croissance exponentielle sur **TY** sont ensemencées sur milieu semblable à l'**YMA** où le mannitol est remplacé par 0.1% d'inositol et 0.2% de pectine.

L'incubation dure 7 jours à 30°C. Les boîtes sont ensuite rincées délicatement à l'eau de robinet puis remplies d'une solution de rouge de Ruthénium 0.05% et laisser agir pendant 30 min. Un halo décoloré autour des colonies indique une activité pectinolytique.

#### **III.3.3. Activité cellulolytique**

Les souches sont mises en culture sur le milieu **YMA** contenant 0,25 % (p/v) de carboxymethyl cellulose (CMC) pendant 5 jours. Après incubation à 30°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis inondées d'une solution de NaCl 1M et laissées pendant 30 minutes à température ambiante; puis vidées.

Un halo jaune orangé entoure les colonies qui montrent une présence de l'enzyme.

### **III.4. Résistance aux métaux lourds**

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches de résister à différents types de métaux lourds. Pour déterminé la concentration minimale inhibitrice, en cultivant les différents isolats sur milieu TY contenant différentes concentrations des métaux lourds suivants :  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  et  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . L'incubation se fait pendant 3 à 7 jours à 28°C, puis mesurer la DO à 600 nm.

Les concentrations utilisé sont : 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 5000  $\mu\text{g/ml}$ , 8000  $\mu\text{g/ml}$ .

*Chapitre III :*

*Résultats et  
discussion*

## I. Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats

### I.1. Isolement et identification

Dans cette étude nous avons tenu compte de 5 isolats à partir des nodules récoltés à des racines d'*A. mareoticus* prélevé sur le site de Fontaine des gazelles, wilaya de Biskra (**Tableau 03**), dont les colonies absorbent très peu ou pas le rouge Congo, les autres colonies contaminants sont fortement colorées et acidifient rapidement le milieu Glucose-Peptone-Agar en présence du Pourpre de Bromocrésol.

En comparant les isolats avec deux souches témoin (**A6, HCNT1**), il a été remarqué, selon des études récentes, que leurs caractères cultureux et morphologiques présentent le profil du genre *Rhizobium*.

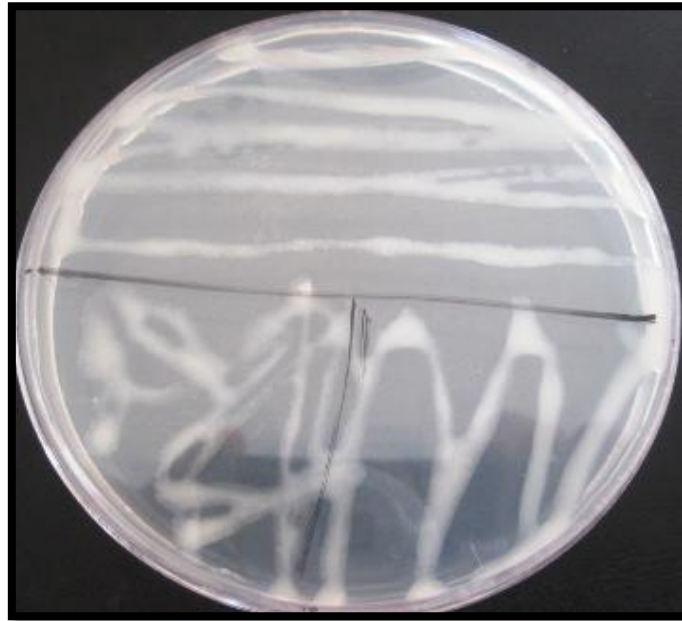
Parmi les méthodes d'identification du genre *Rhizobium*, nous nous sommes basés sur celles préconisée par **Vincent (1970)**, **Beck et al (1993)** et **Somasegaran et Hoben (1994)**.

**Tableau 03** : Isolats et Souches de référence utilisés.

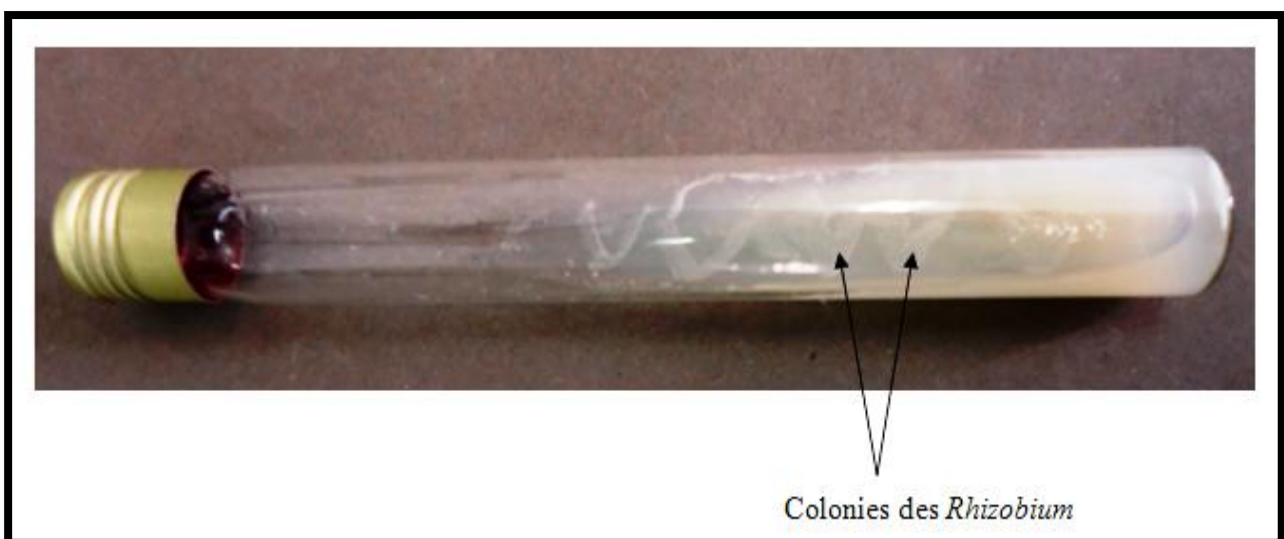
Code de la souche	Nom de la souche	Plante hôte	Origine géographique	Source
<b>A6</b>	<i>Rhizobium sullae</i> A6	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine, Algérie	A. Benguedouar-Constantine
<b>HCNT1</b>	<i>R. sullae</i> HCNT1	<i>H. coronarium</i>	Volterro, Italie	S. Casella- Pise
<b>K1</b>	Isolats	<i>A. mareoticus</i>	Fontaine des gazelles, Biskra	Cette étude
<b>K7</b>	Isolats	<i>A. mareoticus</i>	Fontaine des gazelles, Biskra	Cette étude
<b>K9</b>	Isolats	<i>A. mareoticus</i>	Fontaine des gazelles, Biskra	Cette étude
<b>K11</b>	Isolats	<i>A. mareoticus</i>	Fontaine des gazelles, Biskra	Cette étude
<b>K20</b>	Isolats	<i>A. mareoticus</i>	Fontaine des gazelles, Biskra	Cette étude

## I.2. Aspect des colonies

La culture des isolats symbolisés par **K1**, **K7**, **K9**, **K11** et **K20** sur le milieu **YMA** (boîtes et tubes), a permis d'obtenir des colonies de forme circulaire, convexe, translucides, légèrement relevées de texture crémeuse, transparentes ou opaques et mucilagineuses. Les colonies apparaissent au bout de 48h à 72h, ce qui indique que ce sont de croissance rapide (**Figure 15** ; **Figure 16**).



**Figure 15** : Aspect des colonies sur **YMA** (isolat **K1**).



**Figure 16** : aspect des colonies sur **YMA** incliné (isolat **K1**)..

### I.3. Croissance sur les différents milieux de cultures

Sur le milieu **YMA-RC**, les isolats diffèrent dans leur absorption du milieu; on trouve celles qui ne l'absorbent pas et gardent leur couleur blanchâtre (**K11**, **K20** et souches de référence), ou absorbent faiblement de la couleur rose (**K1**, **K7**, **K9**) (**Tableau 4 ; Figure 17**).

Sur le milieu **GPA+BCP**, il n'y a pas de changement de couleur (pas d'acidification) pour toutes les souches, les isolats ne changent pas alors le pH (**Tableau 04 ; Figure 18**).

Les mêmes observations sont constatées à travers les travaux de **Maougal (2006)**, **Benahmed (2010)**.

Ces caractères, propres aux bactéries nodulant les légumineuses, en particulier le genre appartenant à la famille des *Rhizobiacées* (**Vincent, 1970; Somasegaran et Hoben., 1994**).

**Tableau 04** : croissance des souches sur les différents milieux.

Isolat	YMA-RC	YMA-BTB	GPA-BCP
<b>A6</b>	+	acidification	Pas d'acidification
<b>HCNT1</b>	+	acidification	Pas d'acidification
<b>K1</b>	+	acidification	Pas d'acidification
<b>K7</b>	+	acidification	Pas d'acidification
<b>K9</b>	+	acidification	Pas d'acidification
<b>K11</b>	+	acidification	Pas d'acidification
<b>K20</b>	+	acidification	Pas d'acidification

“ +”= bonne croissance.

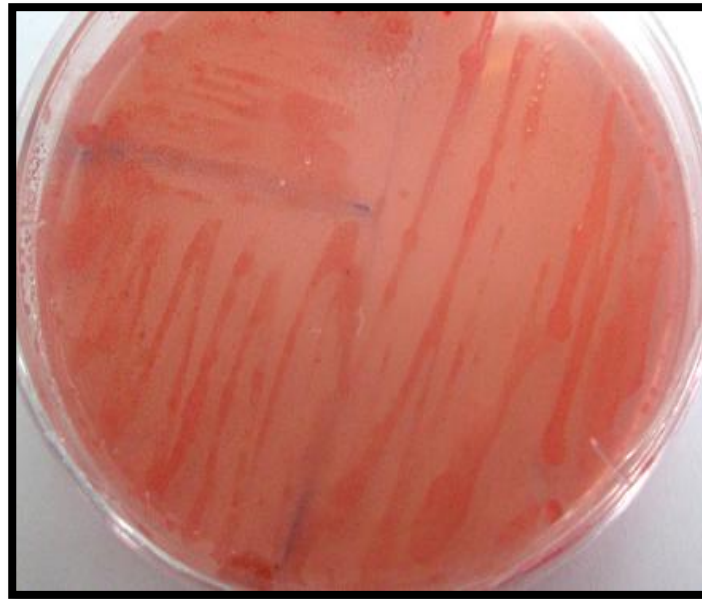


Figure 17 : aspect des colonies sur milieu YMA-RC (isolat K9).



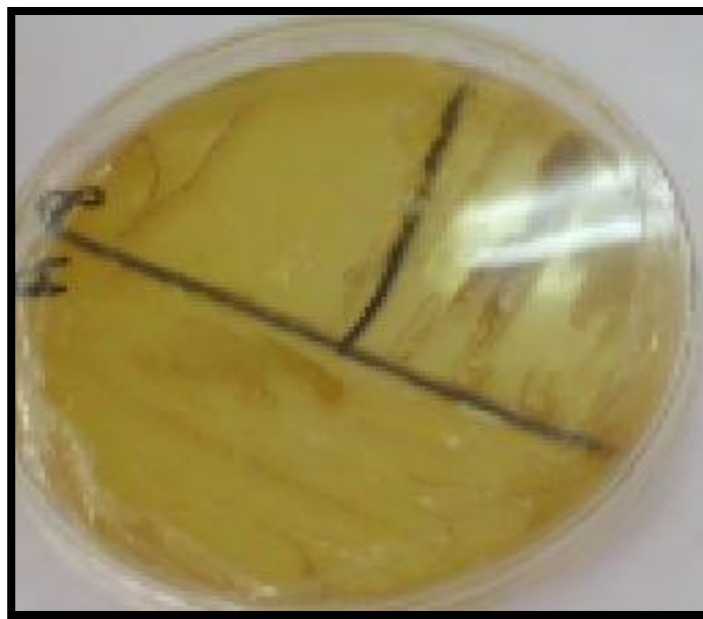
Figure 18 : aspect des colonies sur milieu GPA-BCP (isolat K1).

#### I.4. Vitesse de croissance

Les isolats modifiant partiellement le pH sur milieu YMA+BTB après 24 heures d'incubation, mais après 48h les souches acidifient totalement le milieu (Tableau 04 ; Figure 19), c'est le même résultat obtenu sur les souches rhizobienne dans les travaux de Frémont(1999), Elboutahiri (2010).

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

Selon **Jordan (1984)**, 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. On peut donc conclure que nos isolats sont des bactéries à croissance rapide.



**Figure 19** : aspect des colonies sur milieu **YMA-BTB** (isolat **K 20**)

## **I.5. Examen microscopique**

### **I.5.1. Coloration de Gram**

L'observation microscopique des cellules bactériennes permet d'observer des bâtonnets courts roses de différentes tailles, Gram négative (**Figure 20**).

Toutes les espèces du *Rhizobium* montrent une couleur rose et sont donc Gram négative (**Beck et al, 1993**).



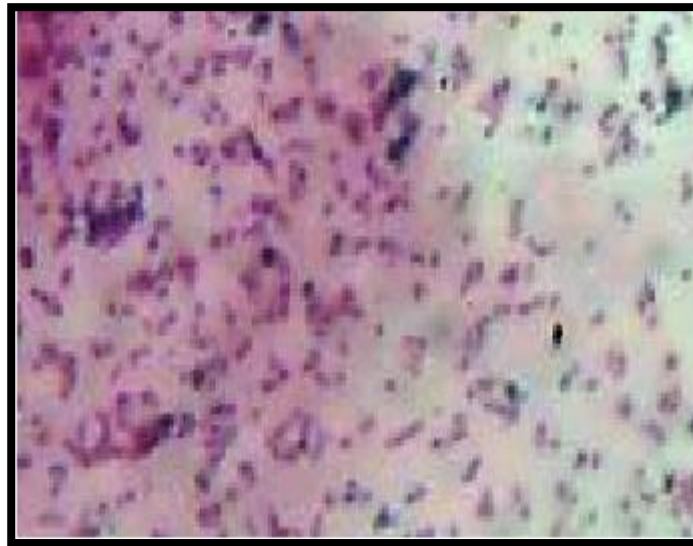


Figure 20 : coloration de Gram (isolat K11).

### I.5.2. Examen de la mobilité

Après avoir réaliser une piqûre centrale par l'anse de platine contenant une suspension bactérienne dans un tube contenant du Mannitol mobilité incubé à 30°C pendant 72h, on observe un changement de couleur du rougeâtre vers la couleur jaunâtre et diffusion dans le milieu. Donc les isolats isolées sont mobiles avec une acidification du milieu ce qui indique que les isolats fermentent le mannitol (**Figure 21**). Ces résultats confirment la bibliographie, indiquant que les *rhizoba* sont mobiles grâce a des flagelles.



Figure 21 : examen de mobilité (résultat positive).

## II. Caractérisation phénotypique des isolats

### II.1. Test nutritionnel

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

Après l'incubation, les solutions de culture apparaissent blanchâtre, trouble (un taux de turbidité important). La mesure de la densité optique présente dans l'annexe 2a et la figure 22, fait apparaître que le Galactose est le sucre le mieux assimilé par les isolats **K1**, **K9**, **K11**, la même constatation remarqué avec le Saccharose pour les souches **K7** et **K20**, par contre ce dernier sucre c'est le moins utilisé pour les souches de références **A6** et **HCNT1**, elles ont une grande assimilation avec le Fructose et Glucose successivement.

Les résultats de cette étude montrent que les isolats utilisent tous les sucres testés comme seul source de carbone mais avec une différenciation entre l'un et l'autre ayant une bonne croissance soit avec les monosaccharides ou sucres simple (Glucose, Galactose, Fructose), soit avec les disaccharides ou sucres composé (Saccharose, Maltose), ce qui est confirmé par **Vincent (1970)**, **Jordan (1984)**, **Somasegaran** et **Hoben (1994)**. Les *rhizobia* différents dans leur aptitude à assimiler les différentes sources de carbone (**Allen et Allen, 1950**). Ainsi que les *rhizobia* à croissance rapide utilisent une large gamme de carbohydrates comme source de carbone par rapport aux *rhizobia* à croissance lente (**Graham et Parker, 1964**).

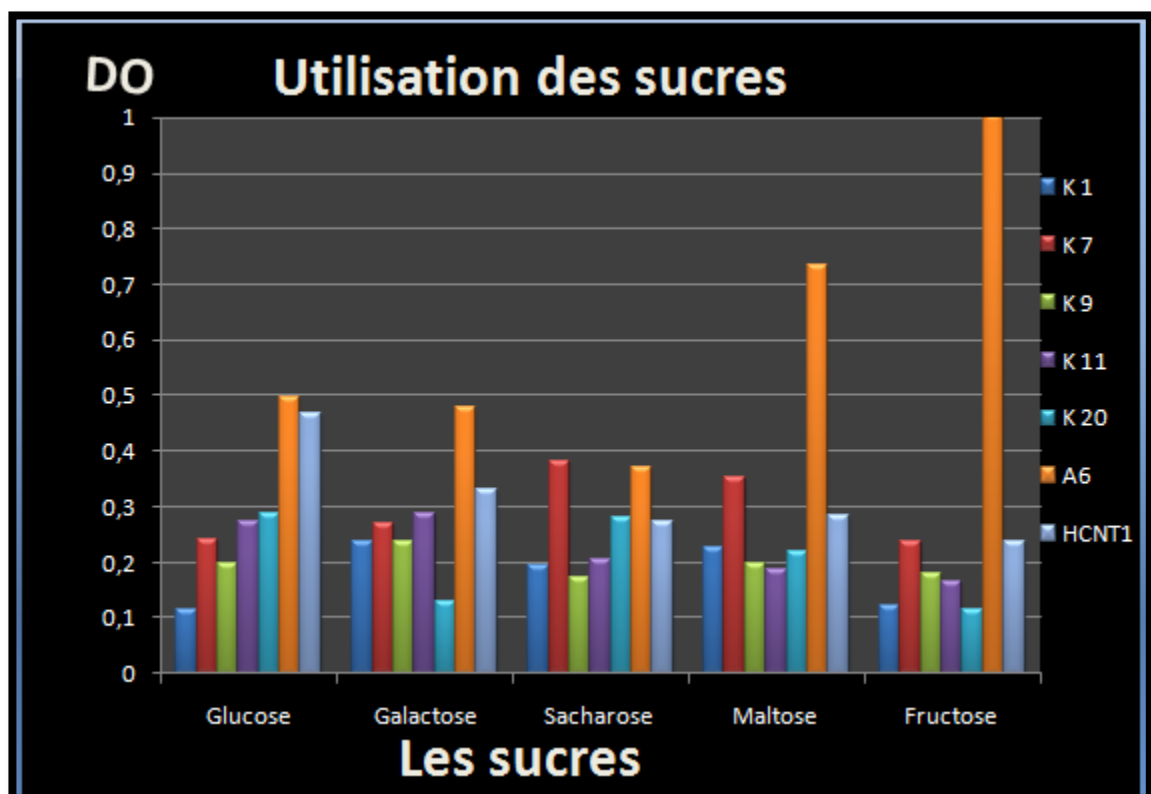


Figure 22 : utilisation des sucres comme seul source de carbone

II.2. Tests physiologiques

II.2.1. Effet de la température

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YMA, une croissance importante des isolats est enregistré à 28°C et à 30°C (Tableau 05 ; Figure 23), cela est en concordance avec les travaux de Domergue (2006), Elboutahiri et al (2010), Shetta et al (2011).

Alors qu'à une température de 20°C et 37°C, on remarque une moyenne croissance pour toutes les souches à l'exception de souche K11 dont la croissance est inhibée à 37°C. À 4°C, pas de croissance observée sauf l'isolat K11 ayant une moyenne croissance à 4°C.

On a remarqué la présence d'un degré de similitude forte entre les isolats testés et les souches de référence sauf l'isolat K11 qui n'a aucune tolérance à la température élevée. Alors on peut dire que les isolats présentent une bonne thermotolérance.

Bien sur il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodules certaines légumineuses dans les régions arctiques (ou bien celles isolées dans l'environnement chaud et sec de la Savane du Sahel en Afrique et qui peuvent tolérer des températures au-delà de 40°C (El Hillali, 2006).

Les résultats obtenus sont comparables à celles indiqués par Mokrani (2001), dans leur étude de la symbiose : *Hedysarum coronarium* L – *Rhizobium süllea*.

Tableau 05 : Effet de température.

Température \ Isolats	4°C	20°C	28°C	30°C	37°C
A6	-	±	+	+	+
H	-	±	+	+	±
K1	-	±	+	+	±
K7	-	±	+	+	±
K9	-	±	+	+	±
K11	±	±	+	+	-
K20	-	±	+	+	±

“ + ” = bonne croissance, “ ± ” = moyenne croissance, “ - ” = pas de croissance.

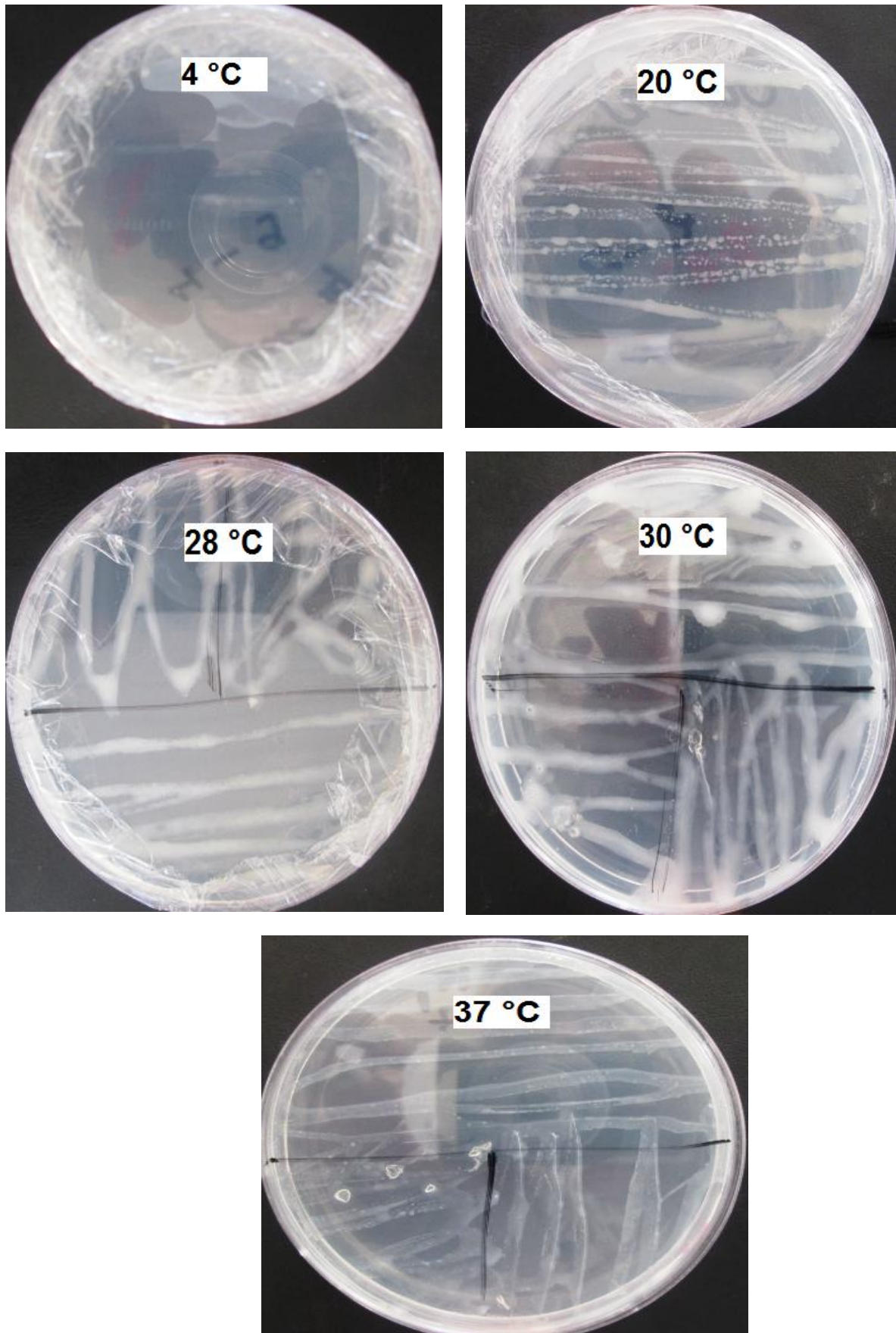


Figure 23 : effet de la température (isolat K 7).

### II.2.2. Tolérance au pH

En ce qui concerne la tolérance à l'acidité et à l'alcalinité, tous nos isolats peuvent survivre à un pH variant de 5 à 8, avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant à pH 6.8, mais avec une nette différence dans le taux de croissance de ses souches (**Annexe 2b; Figure 24**). Une faible croissance est observé à pH 5 et à pH 8 ; à l'exception des isolats **K9**, **A6** et **HCNT1** dont la croissance est moyenne. Alors que les pH acides sont plus tolérés que les pH alcalins pour les isolats **K1** et **K20**, et le contraire pour les isolats **K7** et **K11** qui préfèrent des pH alcalins.

Plusieurs travaux montrent que le *Rhizobium* se caractérise par une grande différence dans la tolérance de pH. **El-hillali (2006)**, à rapporté que leur souches des *Rhizobium* étudiées ont généralement un taux de croissance rapide et sont globalement tolérantes à l'alcalinité et majoritairement tolérantes à l'acidité.

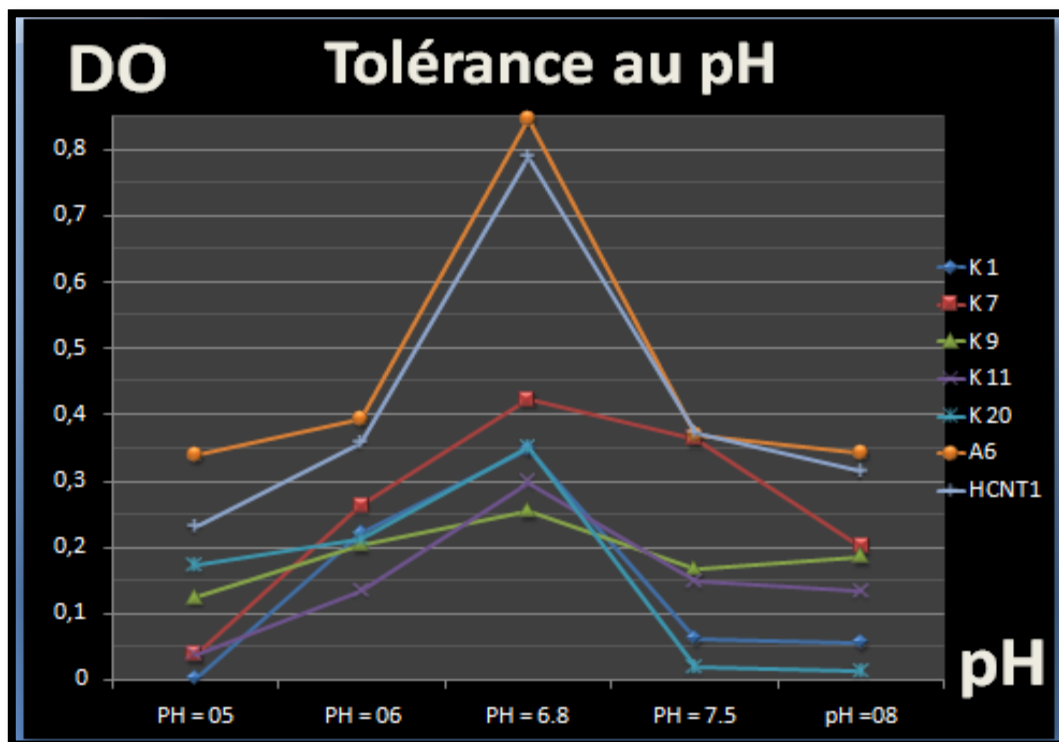


Figure 24 : tolérance au pH.

### II.3. Tests biochimiques

#### II.3.1. Réduction des nitrates

Après l'incubation et l'addition des réactifs I et II du nitrate réductase, les souches testés en présence les souches de référence donnent une couleur rougeâtre, se qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites (**Tableau 06 ; Figure 25**). La

réduction des nitrates en nitrites constitue des caractères taxonomique importants (Joffin et al., 2006). Les mêmes observations sont constatées à travers les travaux de Bristou (1971).

Plusieurs publications démontrent que le perfectionnement de la fixation d'azote est dû à la présence du nitrate réductase dans le bactéroïdes,

Tableau 06 : Résultats des tests biochimique.

Isolats	K 1	K 7	K 9	K 11	K 20	A6	HCNT1
Tests							
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+
Activité pectinolytique	+	+	+	+	+	+	+
Activité cellulolytique	-	-	-	-	-	-	-

“+” = résultat positive, “-” = résultat négative.



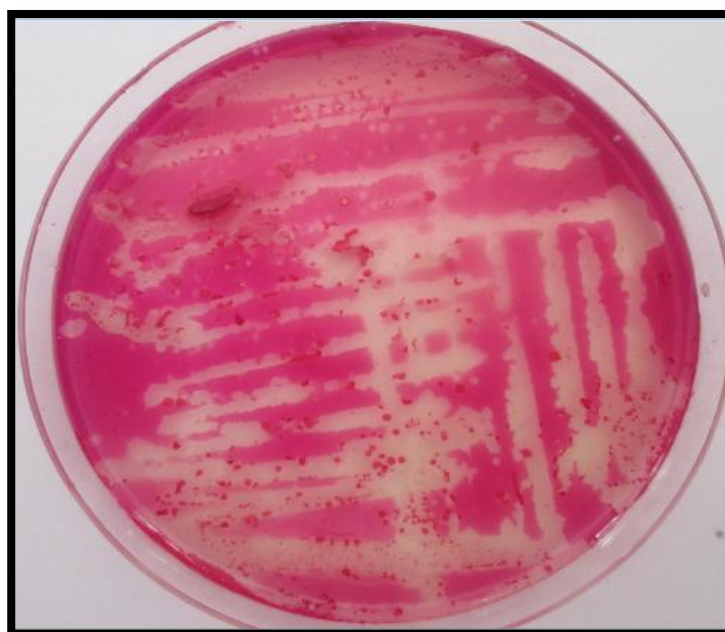
Figure 25 : réduction de nitrate (résultat positive).

### II.3.2. Activité pectinolytique

Après l'addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec de l'eau, un halo clair est observé autour des colonies indiquant la présence d'une activité poly-galacturonasique, car l'unité structurale de la pectine est l'acide galacturonique (**Bristou, 1971**). Tous les isolats ont une réaction positive. (**Tableau 06 ; Figure 26**).

Plusieurs études sur les *rhizobia*, confirment la présence de cette activité, telles que les travaux de **Martinez-Molina et Olivars (1982)**, **Rathore et al., (2009)**.

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



**Figure 26** : activité pectinolytique (résultat positive).

### II.3.3. Activité cellulolytique

Après l'addition du NaCl 1M et le rinçage avec de l'eau, aucun changement n'est observé sur les boîtes (absence d'un halo jaune orange), signifiant une activité cellulolytique négative (**Tableau 06 ; Figure 27**).

**Lindström et Lehtomäki (1988)**, rapportent que la présence d'un halo jaune orangé autour des colonies met en évidence la présence de l'enzyme endoglucanase, aussi **Chabbi (2010)** et **Torche (2008)**, supposent que les colonies des souches de *rhizobia* apparaissant sur un fond rouge entourés d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence l'activité cellulolytique, C'est-à-dire il ya un problème dans la réalisation de ce test au niveau de laboratoire (les souches de références possèdent cette activité, mais le résultat négatif enregistré nous conduit à soupçonner les produits du laboratoire).

A travers les résultats obtenus, notamment les caractéristiques morpho-culturelles, les enzymes spécifiques liés à l'interaction plante-microorganisme, les caractères distinguant le genre *Rhizobium*, nous pouvons avancer que les isolats présentent une morphologie et un aspect cultural propre aux rhizobia, comme le rapporte certains auteurs notamment **Vincent (1970)**, **Jordan (1984)**, **Somasegaran et Hoben (1994)**.



**Figure 27** : activité cellulolytique (**isolat K11**) (résultat négative).

#### II.4. Résistance aux métaux lourds

Les concentrations inhibitrices sont déterminées après incubation sur **TY** en présence des métaux lourds pendant 7 jours à 30°C.

La tolérance des souches aux métaux lourds est très variable (**Tableau 07**). La concentration la plus élevée est enregistrée avec l'acétate de plomb (1000 à 5000 µg/ml) pour toutes les souches, alors que la concentration la plus faible est enregistrée avec le mercure (50 à 100 µg/ml). Toutes les souches examinées possèdent la même concentration inhibitrice pour le zinc (500 µg/ml) sauf l'isolat **K9** (100 µg/ml).

L'inhibition s'est révélée plus importante selon l'ordre suivant:  $\text{HgCl}_2 > \text{ZnCl}_2 > \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , ces résultats sont comparables avec les travaux de **Chabbi (2010)**.



La résistance des bactéries du sol aux métaux lourds est très importante pour la croissance des plantes en particulier les légumineuses dans les sols contaminés. Généralement les gènes de résistance aux métaux lourds sont portés par des plasmides et des transposons (**Gharzouli, 2006**).

**Tableau 07 : La CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des isolats en présence de différents métaux lourds**

<b>souches métaux</b>	<b>K1</b>	<b>K7</b>	<b>K9</b>	<b>K11</b>	<b>K20</b>
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>100</b>	<b>500</b>	<b>500</b>
<b>Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></b>	<b>1000</b>	<b>5000</b>	<b>1000</b>	<b>5000</b>	<b>1000</b>

**CMI : La concentration minimale inhibitrice**

*Conclusion et  
perspective*

### Conclusion et perspective

La population des rhizobia dans chacun des sols caractérisés n'est pas homogène mais il s'est avéré qu'elle est composée de bactéries phénotypiquement et génétiquement très distinctes.

Une caractérisation des isolats comporte une étude phénotypique en présence des souches témoins du genre *Rhizobium* isolées à partir des nodules de *H. coronarium*.

L'aspect morphologique des isolats et souches de références sur les différents milieux de cultures montre qu'ils ont une croissance rapide, cette croissance rapide est d'une grande importance pratique surtout dans les stratégies de production d'inoculum. La croissance sur milieu **YMA-RC** montre que les souches absorbent peu ou pas du rouge Congo. Les souches n'acidifient pas le pH sur le milieu **GPA-BCP** et provoquent une réaction acide sur **YMA-BTB** en 24 heures. L'examen microscopique par coloration de Gram révèle des bâtonnets Gram négatif et de différentes tailles.

L'identification phénotypique comporte une série de tests qui englobe des tests nutritionnels, physiologiques et biochimiques, la recherche des concentrations inhibitrices par les métaux lourds.

Les résultats des tests nutritionnels ont montré la capacité des *Rhizobium* à utiliser une grande chaîne de sucres, et n'exigent pas le mannitol comme seule source de carbone. Pour les tests physiologiques, tous les isolats ont la capacité de se développer dans différentes valeurs de pH acide et base et à des températures différentes, La température optimale est de 28°C à 30°C et le pH optimum est de 6,8, ils sont globalement tolérants à l'alcalinité et majoritairement tolérants à l'acidité. Les tests biochimiques. dans le but de recherche des enzymes spécifiques nécessaires à la relation symbiotique démontrent que les souches sont pourvues d'un nitrate réductase et polygalacturonase, malheureusement l'activité cellulolytique (détection la présence de endogluconase) a un résultat négatif.

La résistance des isolats aux métaux lourds testés a montré que la concentration minimale inhibitrice (CMI) est différente pour chaque isolat, l'inhibition s'est révélée plus importante selon l'ordre suivant:  $HgCl_2 > ZnCl_2 > Pb(CH_3COO^-)_2$ .

Notre travail est une première démarche pour la caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse *Astragalus mareoticus* de la région de Fontaine des gazelles, Biskra afin des les identifier, les nommer et les classer (pour les classer dans la taxonomie bactérienne).

Nous avons effectué quelques analyses phénotypiques qui restent à développer dans l'avenir et pourquoi pas faire des études plus poussées via les séquençages de l'ARN 16S.

***Références  
bibliographique***

## Références bibliographique

1. **Abdelguerfi A., Abdelgurfi-Laouar M., 2004** : Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et-ou pastoral : diversité, collecte et valorisation au niveau Méditerranéen. CIHEAM. 62 : 29-41.
2. **Alami Y., Champolivier L., Merrin A., Thierry H., 1999** : Oléagineux, Corps Gras, Lipides : Rôle de *Rhizobium* sp. dans l'agrégation du sol rhizosphérique du tournesol: conséquences sur la croissance et la résistance de la plante à la contrainte hydrique. Vol. 6. No 6 : 524-528.
3. **Allen E. K., et Allen O. N., 1950** : Biochemical and Physiological properties of the *rhizobia*. Bacteriol. Rev. 14 : 173-330.
4. **Anonyme.** Biological Nitrogen Fixation. Page web, consultée en janvier 2014:
5. **Beck D.P., Materon L. A., Afandi F., 1993** : Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.
6. **Benahmed A., 2010** : Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium*. Thèse de Magistère, Université Mantouri Constantine, Algérie.
7. **Benarous K., 2006** : Effets des extraits de 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.
8. **Berrada H., Fikri-Benbrahim K., 2014** : Taxonomy of the *Rhizobia* : Current Perspectives. Faculty of Sciences and Technology, Sidi Mohammed Ben Abdellah University. Maroc. British Microbiology Research Journal 4(6) : 616-639.
9. **Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L., 2006** : Détection et typage du gène *nod C* à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des *rhizobia*. Les Actes du BRG : 97-110.
10. **Boukli N.M., Sunderasan E., Bartsev A., Hochstrasser D., Perret X., Bjourson A.J., Krause A., Brouhton W.J., 2006** : Early legume responses to inoculation with *Rhizobium* sp. NGR234. Journal of plant physiology : 1-13.
11. **Brewin N J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992** : Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York 3 : 239-248.
12. **Bristou J., 1971** : Techniques d'enzymologie bacterienne. Masson et C<sup>ie</sup> : 155-222.
13. **Broughton W. J., Jabbouri S., Perret X., 2000** : Keys to Symbiotic Harmony. Journal of Bacteriology 182 (20) : 5641-5652.
14. **Chabbi. R., 2010** : Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Thèse de Magistère, Université Mantouri Constantine, Algérie.

15. **Chakrabarti S. K., Lee M., Gibson A. H., 1981:** Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. *Soil Biol. Biochem* : 349-354.
16. **Come D., Francoise C., 2006 :** Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes. Edition Tec et Doc. Lavoisier.
17. **Davet P., 1996 :** Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris. France : 145-161.
18. **Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C., 2001:** nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica Minireview*. 48 (2) : 359-365.
19. **Dénarié J., 2000 :** Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
20. **Domergue O., 2006 :** Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études.
21. **Dreyfus B. L., 1982 :** La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata* : Légumineuse a nodules caulinaires. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Paris VII.
22. **Duhoux E., Nicole M., 2004 :** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France : 1-20.
23. **El 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, Rabat, Maroc.
24. **Elboutahiri N., Thami A. I., Udupa M.S., 2010 :** Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*. Maroc : 1471-2180.
25. **Elkan G. H., 1967 :** Some effects of medium composition and metabolic intermediates on biotin inhibition in a strain of *Rhizobium japonicum*. *Can J. Microbiol* : 533-542.
26. **Elkan G. H., Kurik. I., 1968 :** Nitrogen, energy and vitamin nutrition of *Rhizobium japonicum*. *J. Appl Bacériol* : 399-404.
27. **Farhi A., 2001 :** Macrocéphalie et pôles d'équilibre: la wilaya de Biskra. *L'Espace géographique*, N°3 : 245-255.
28. **Fitouri. S., 2011 :** Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du Nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques, Institut national agronomique. Tunisie.
29. **Franco A. A., De Faria M. S., 1997 :** The contribution of N<sub>2</sub> fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem*. 29 : 897-903.

30. **Frank B., 1889** : Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtsc. Bot. Ges : 332-346.
31. **Frémont M., Prin Y., Chauviere M., Diem H.G., Pwee K.H., Tan T.K., 1999** : A comparaison of *Bradyrhizobium* strains using molecular, cultural and field strains. Plant science, 141 : 81-91.
32. **Gharzouli R., 2006** : Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium sp*, Thèse de Magister, Université Mentouri Constantine, Algérie.
33. **Graham P.H., Parker C. A., 1964** : Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. Plant Soil. 20 : 383- 396.
34. **Guignard J. L., 2000** : Biochimie végétale. 2e édition. Edition Dunod. Paris France.
35. **Guiraud J. P., 1998** : Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.
36. **Hopkins W. G., 1999** : Introduction to plant physiology, second edition. John Wiley andsons, Inc.
37. **Hopkins W. G., 2003**: Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille.Edition de boeck : 99-119.
38. **Jensen H. L., Schroeder M., 1965** : Urea and biuret as nitrogen sources for *Rhizobium spp*. J. Appli. Bacteriol : 473-478.
39. **Joffin J-N., Leyval Guy., 2006** : Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4<sup>e</sup> édition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.
40. **Jordan D.C., 1984** : Rhizobiaceae. In N. R.Krieg and J.G.Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. the Williams & Wilkins, Co., Baltimore : 234-245.
41. **Juergen Prell and Philip Poole., 2006** : Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. School of Biological Sciences, University of Reading, UK, RG6 6AJ.
42. **Kneip C., Lockhart P., Voss C., Maier U.G., 2007** : Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. BMC Evol Biol 7.
43. **Lakhel A., 2011** : Effets de certains inducteurs de gènes nod (composés phénoliques) sur la croissance de *Rhizobium* en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique, Thèse de Doctorat, université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.
44. **Lazrek-Ben Friha F., 2008** : Analyse de diversité génétique et symbiotique des populations naturelles Tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse, France.
45. **Leclerc H., Gaillard L. J., Simonet M., 1995** : Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. DOIN EDITEURS : 412-415.

46. **Lindström K., Lehtomäki S., 1988** : Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 50 : 277-287.
47. **Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-allemant C., 2005** : Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Edition Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne : 67-70.
48. **Madigan M., Martink J., 2007** : Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Edition Person Education France : 599-601, 676-681.
49. **Maougal R. T., 2006** : Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum*. L) : Inoculation et nodulation. Mémoire de Magister de l'Université Mentouri de Constantine, Algérie.
50. **Martinez-Moline M., Olivars J., 1982** : A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. App. Environ. Microbiol.38 : 1186-1188.
51. **Moëne-Loccoz Y., Nesme X., Grundmann G. L., 2005**: Development and validation of a prototype 16Sr RNA based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria. Environmental Microbiology.
52. **Mokrani D., 2001** : Etude de la symbiose : *Hedysarum coronarium* L-*Rhizobium* « *hedysari* ». Essai de production d'un inoculum. Mémoire de Magister de l'Université Mentouri de Constantine, Algérie.
53. **Moussi A. H., 2012** : Analyse systématique et étude bioécologique de la faune des acridiens (*Orthoptera*, *Acridomorpha*) de la région de Biskra. Thèse de Doctorat université de Constantine. Algérie.
54. **Pelmont J., 1995**: bactérie et environnement adaptation physiologique. Edition Office des Publications Universitaires. Vol 2.
55. **Peret B., 2007** : Transport de l'auxine et developpement du nodule actinorhzien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II.
56. **Perry J. J., Stalex J. T., Lory S., 2004** : Microbiologie cours et questions de revision. Edition DUNOD. Paris. France.
57. **Quezel P., Santa S., 1962** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France.
58. **Rathore M.S., Shekhawat N.S., Gehlot H.S., 2009** : Need of Assessing Rhizobia for Their Plant Growth Promoting Activities Associated with Native Wild Legumes Inhabiting Aravalli Ranges of Rajasthan, India. Botany Research International 2 (2) : 115-122.



59. **Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E., 2007:** Biologie végétale. 2e édition. Edition de boeck. Paris France : 653-660.
60. **Richter G., 1993 :** Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes : 341-352.
61. **Rigaud J., 1965 :** contribution à l'étude d'un milieu synthétique pour la croissance de *Rhizobium*. Ann Inst. Pasteur : 272-279.
62. **Roger P., 1996 :** La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le developpement ? Conference debat de l'ORSTOM. Paris Xe France.
63. **Sanchez F., Padilla J. E., Hector P., Lara M., 1991:** Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 507-528.
64. **Saoudi. M., 2008 :** Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.L.P) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister de l'Université Mentouri de Constantine, Algérie.
65. **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.
66. **Shetta D. N., Al-Shaharani S. T., Abdel-Aal M., 2011 :** Identification and Characterization of *Rhizobium* Associated with Woody Legume Trees Grown under Saudi Arabia Condition. Department of Plant Production. Université de King Saud, American-Eurasian.10 (3) : 410-418.
67. **Somasegaran. P., Hoben. H.J., 1994 :** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.
68. **Sprent J. I., 1984:** Nitrogen fixation. Advanced plant physiology. Ed Malcolm B Wilkins.
69. **Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P., 1998:** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology. 84(1) : 81-89.
70. **Svistoonoff S., 2003:** Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de Doctorat de l'université Montpellier II. France.
71. **Tan I. K. P., Broughtom J. W., 1981 :** Rhizobia in tropical legumes-XIV. Ion uptake differences between fast and slow growing strains. Soil Biol. Biochem. : 295-299.
72. **Terefework Z., 2002:** Diversity and phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of *Rhizobium*-legume symbiosis. Academic Dessertation in Microbiology. University of Helsinki. ISSN : 1239-9469.
73. **Torche A., 2006:** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.
74. **Tortora G.J., Funk B.R., Case C.L., 2003:** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. : 826-830.

75. **Tourte Y., Bordonean M., Henry M., 2005:** Le monde des végétaux-organisation, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France.
  76. **Urban J. E., 1979 :** Nondividing, bactéroïde-like *Rhizobium trifolii*: in vitro induction via nutrient enrichment. Appl. Environ. Microbiol : 1173-1178.
  77. **Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J., 1996:** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60 : 407-438.
  78. **Vincent J. M., 1970:** The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.
  79. **Vincent J. M., 1977 :** *Rhizobium*: General microbiology. In A Treatise on dinitrogen Fixation. Section III. Biology. RWF Hardy, W.S. Silver (Eds). Wiley-Interscience, New York : 277-366.
  80. **Wajcman 2002 :** L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme: un motif structural unique, des fonctions multiples. Edition Scientifiques et médicales Elsevier SAS : 1159-1174.
  81. **Werner D., 1992 :** symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.
  82. **Woese CR., 1987 :** Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51 : 221-71.  
[www. national forage and grasslands curriculum](http://www.nationalforageandgrasslandscurriculum.org/)
- Zakhia F., de Lajudie P., 2001 :** Taxonomy of Rhizobia. Mini-review. Agronomie, 21 : 569-576.

### Site d'internet :

**Site 1 :** [http://es.wikipedia.org/wiki/Astragalus\\_mareoticus](http://es.wikipedia.org/wiki/Astragalus_mareoticus). Consultée en mai 2014.




**Site 2 :** <http://ar.wikipedia.org/wiki/Loutaya>. Consultée en mai 2014.

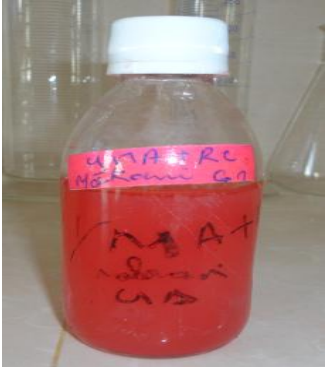


**Site 3 :** [www.sahara nature.com](http://www.saharanature.com). Consultée en avril 2014.

***Annexe***

## Annexe 1 :

## Milieux de cultures et solutions nutritives utilisés (Vincent, 1970)

Milieu	Composition	Quantité	Photo
<b>YMB</b> (Yeast Mannitol Broth)	Mannitol K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O NaCl Extrait de levure Eau distillée	10.00 g 0.50 g 0.20 g 0.10 g 0.50 g 1000ml	
<b>YMA</b> (Yeast Mannitol Agar)	<b>YMB</b> Agar	1000ml 15 g	
<b>TY</b> (Tryptone Yaest)	Tryptone Extrait de levure CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O Eau distillée	5 g 3 g 0,87 g 1000 ml	
<b>RC</b> (Solution stock de rouge Congo)	Rouge Congo Eau distillée	0.25 g 100 ml	
<b>BTB</b> (Solution stock de bleu de bromothymol)	bleu de bromothymol Ethanol	0.5 g 100ml	

<b>BcP</b> (Solution stock de pourpre de bromocrésol)	pourpre de bromocrésol Ethanol	1 g 100 ml	
<b>YMA-RC</b>	YMA Solution stock de rouge Congo	1000 ml 10 ml	
<b>YMA- BTB</b>	YMA Solution stock de bleu de bromothymol	1000 ml 10 ml	
<b>GPA- BCP</b> (Glucose Peptone Agar + BCP)	Peptone Glucose Agar Solution stock BCP Eau distillée	5 g 10 g 18 g 10 ml 1000 ml	

Le PH des milieux ajusté a 6,8, et la stérilisation est réalisée a 120 C pendant 20 min.

## Annexe 2 :

a. mesure de densité optique (test de source de carbone).

<b>Isolats</b>	<b>K 1</b>	<b>K 7</b>	<b>K 9</b>	<b>K 11</b>	<b>K 20</b>	<b>A6</b>	<b>HCNT1</b>
<b>Sucres</b>							
<b>Glucose</b>	0.114	0.240	0.197	0.272	0.286	0.496	0.466
<b>Galactose</b>	0.238	0.269	0.237	0.288	0.131	0.480	0.331
<b>Saccharose</b>	0.194	0.381	0.174	0.206	0.282	0.371	0.273
<b>Maltose</b>	0.226	0.353	0.196	0.186	0.220	0.734	0.284
<b>Fructose</b>	0.121	0.237	0.180	0.165	0.115	1.005	0.239

b. Tolérance au pH testée pour les isolats méthode par la DO.

<b>Isolats</b>	<b>K 1</b>	<b>M 7</b>	<b>K 9</b>	<b>M 1</b>	<b>M 10</b>	<b>A6</b>	<b>HCNT1</b>
<b>pH</b>							
<b>PH = 05</b>	0.002	0.037	0.123	0.038	0.172	0.340	0.230
<b>PH = 06</b>	0.221	0.262	0.203	0.134	0.212	0.392	0.357
<b>PH = 6.8</b>	0.348	0.422	0.255	0.298	0.350	0.845	0.790
<b>PH = 7.5</b>	0.062	0.364	0.167	0.148	0.018	0.369	0.373
<b>PH = 08</b>	0.056	0.201	0.186	0.132	0.012	0.341	0.314

## Résumé

On à sélectionné 5 isolats des bactéries nodulant la légumineuses d'*Astragalus mareoticus*, isolés de la région de Fontaine des gazelles wilaya de Biskra, pour la réalisation de ce travail.

La caractérisation phénotypique des isolats portent sur une étude morphologique suivie d'une série des tests nutritionnels, biochimiques, physiologiques, aussi la détermination de résistance et de sensibilité des isolats aux métaux lourds.

Phénotypiquement, les isolats donnent des résultats comparables à ceux des souches de référence de genre *Rhizobium* à croissance rapide, ce sont mobile et à forme bâtonnet Gram (-). Les isolats ont une température optimale de 28°C à 30°C. Le pH optimum est de 6.8. Elles utilisent toutes les sucres testés comme source de carbone mais avec une différenciation entre l'un et l'autre. Ainsi que leur résistance des souches aux métaux est très variable. Les tests biochimique pour rechercher des enzymes, montrent que les *Rhizobia* possèdent des enzymes nitrates réductase et polygalacturonase.

**Mots clés :** légumineuses, *Astragalus mareoticus*, caractérisations phénotypique, *Rhizobium*.

## Abstract

Five selected isolates of bacteria nodulating the legume *Astragalus mareoticus* isolated from area Fontaine gazelles wilaya of Biskra, for studied their caracter.

The phenotypic characterization of the isolates carry on a morphological study followed by a series of tests nutritional, biochemical and physiological, also the determination of resistance and susceptibility of isolates to heavy metals.

Phenotypically, isolates yield comparable to those of the reference strains of fast-growing *Rhizobium* results, are movable to and stick shape Gram (-). Isolates with an optimum temperature of 28 ° C to 30 ° C. The optimum pH is 6.8. They all use the tested sugars as carbon source but with a differentiation between the one and the other. And their resistance strains to metals is highly variable. The biochemical tests to search for enzymes, shows the *rhizobia* have shown enzyme of nitrate reductase and polygalacturonase

**Key words :** legumes, *Astragalus mareotcus*, caracterization phenotypic,

## ملخص

تم انتقاء 5 عزلات من البكتيريا العقدية للبقوليات الرعوية من نوع *Astragalus mareoticus* المعزولة من منطقة منبع الغزلان، ولاية بسكرة، لإجراء هذا العمل.

الخصائص المظهرية للعزلات كانت مركزة على دراسة شكلية متبوعة بسلسلة تحاليل غذائية، بيوكيميائية، فيزيولوجية، أيضا تحديد مقاومة وحساسية العزلات للمعادن الثقيلة.

مضهريا، العزلات أعطت نتائج مشابهة للسلاطات الشاهدة من نوع ريزوبيوم ذات نمو سريع، هي متحركة وذات شكل عصيات، Gram سالب. الحرارة المثلى للعزلات كانت من 28° إلى 30° مئوية، أما الحموضة المثلى فهي 6,8، أيضا تستعمل كل السكريات المختبرة كمصدر للكربون بوجود اختلاف من مصدر إلى آخر، في حين وجدنا مقاومتها للمعادن الثقيلة كانت جد مختلفة. التحاليل البيوكيميائية للحث عن إنزيمات بينت أن الريزوبيوم يمتلك إنزيمات إرجاع النيترات وpolygalacturonase.

**كلمات مفتاحية :** البقوليات، *Astragalus mareoticus*، خصائص مظهرية، الريزوبيوم.