



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université de Larbi Tébessi -Tébessa-

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

Département : Biologie des organismes vivants



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Biotechnologie des plantes médicinales

Thème

**Isolement et caractérisation des isolats nodulant la plante médicinale Fenugrec
*Trigonella foenum-grecum L.***

Présenté par :

° Hafnaoui Loubna

° Sahailia Nora

Devant le jury

MrMaalemSouhail	Université de Tébessa	Président
Mr Dekak Ahmed	Université de Tébessa	Rapporteur
M _{me} Segher.Hanene	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 31/05/2016

Note :..... Mention :.....

Dédicace

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mes frères et sœurs

A toute ma famille

A mes amis

S. Nora

H. Soubna

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier notre encadreur, monsieur Dekak Ahmed pour son aide, ses observations, ses suggestions, sa disponibilité et son encouragement qui nous ont permis d'améliorer et réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

J'exprime ma profonde gratitude à monsieur maalem Souhail MCA à l'université de chikh laarbi tébessi- Tébessa, pour sa disponibilité et l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Je ne saurai oublier, dans mes remerciements, Madame Seghir Hanene, MAA à l'université de chikh laarbi tébessi- Tébessa, pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

J'ai une pensée particulière à l'ingénieur de laboratoire de biotechnologie végétale Monsieur Hamdi pour son encouragement et son aide qui à contribuer à faciliter notre travail dans un environnement scientifique et moral dont on à bénéficié au Laboratoire.

الملخص

يهدف هذا العمل لتقييم وتصنيف التنوع المظهري المتواجد ضمن مجموعات البكتيريا المتعايشة المعزولة من العقد الجذرية للنوع النباتي الحلبة (*Trigonella foenum-grecum L.*) من تربة زراعية في منطقة الحمامات (ولاية تبسة).

بعض العزلات أظهرت خصائص مثيرة للاهتمام فهي قادرة على استيعاب مجموعة متنوعة من مواد كربونية و نيترو جينية وكذلك تتحمل درجات حموضة تتراوح من 4-10 وترايز الصوديوم من 2% إلى 10%، ودرجات الحرارة بين 4 درجة و44 درجة.

في ضوء تحليل جميع المعايير المدروسة، تظهر العزلات تنوع بيولوجي ملحوظ بين بعضها البعض ومعدل تشابه مع السلالات المرجعية يساوي 44،49%.

كلمات البحث: محاصرة البكتيريا المتعايشة ، تصنيف التنوع المظهري ،نبات الحلبة (*Trigonella foenum-grecum L.*

Abstract

This work was conducted to evaluate and characterize the phenotypic diversity that exists within a collection of trapped and isolated bacteria from nodules of Fenugreek (*Trigonella foenum grecum L.*) in an agricultural soil located in the area of El Hammamet (Tébessa).

Some isolates have presented interesting characteristics by comparing them with reference strains, they are able to assimilate a lot of carbon and nitrogen substrates, tolerate pH ranging from 2 to 10, NaCl concentrations from 1% to 10% which we can qualify them salt tolerant, and temperatures between 4 ° C and 44 ° C which can advance that they are heat tolerant.

Analysis of the parameters studied; show that isolates present a remarkable biodiversity, with a rate equal to 49.44% similarity with the reference strains.

Key words: Rhizobia Trapping, Phenotypic characterisation, Fenugreek, *Trigonella foenum-grecum L.*

Résumé :

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique qui existe au sein d'une collection de symbiote piégés et isolés à partir de nodosités du Fenugrec (*Trigonella foenum-grecum L.*) à partir d'un sol agricole de la région d'El Hammamet (Tébessa).

Certains isolats ont présenté des caractéristiques intéressantes en les comparants avec les souches de références, ils sont capables d'assimiler une multitude de substrats carbonés et azotés, de tolérer des pH allant de 2 à 10, des concentrations en NaCl de 1% à 10% dont on peut les qualifier comme de halotolérants, et des températures comprises entre 4°C et 44°C dont on peut les envisager qu'ils sont thermo-tolérants.

A la lumière de l'analyse de l'ensemble des paramètres étudiés, les isolats présentent une remarquable biodiversité avec un taux de similarité égale à 49,44% avec les souches de références.

Mots clés : Piégeage de *Rhizobia*, Caractérisation phénotypique, Fenugrec : *Trigonella foenum-grecum L.*

Table des matières

Introduction	1
Revue bibliographique	
I. fixation de l'azote	2
I.1. L'azote	2
I.2. Les sources d'azote du sol	3
a. une source atmosphérique	3
b. une source organique	3
c. une source synthétique	3
I.3. l'azote minéral	4
I.4. Cycle d'azote	4
a. Ammonification	5
b. Nitrification	6
c. Dénitrification	6
I.5. Biologie de l'azote	6
I.6. Les fixateurs libres	7
I.7. Les fixateurs symbiotiques	8
a. Le genre Rhizobium	9
b. Le genre Bradyrhizobium	10
c. Le genre Mesorhizobium	10
d. Le genre Azorhizobium	10
e. Le genre Sinorhizobium	11
II. La symbiose Rhizobium/ Légumineuse	11
II.1. La symbiose	11
II.1.1. La symbiose Rhizobium- légumineuses	11
II.1.2. Les spécificités de la symbiose	12
II.2. L'infection et la nodulation	12
II.3. Le dialogue moléculaire	13
a. Les flavonoïdes	14
b. Les facteurs Nod	14
c. Les gènes nod	16
II.4. L'infection	16
II.5. Le développement des nodules	17
II.6. Différentes zones du nodule	18
a. La zone méristématique	19
b. La zone de préfixation	19
c. La zone de fixation	20
d. La zone de dégénérescence	20
II.7. Biochimie de la fixation	21
II.7.1. La nitrogénase	21
II.7.2. La leghémoglobine	22
II.8. Processus de fixation de l'azote	23
II.9. Les gènes de la fixation	23
II.9.1. Les gènes <i>nif</i>	24
II.9.2. Les gènes <i>fix</i>	24
	25

Matériels et méthodes	
I. Isolement et identification des souches de <i>Rhizobium</i> nodulant <i>Trigonella L.</i>	
I.1. Zones de prélèvements	26
I.2. Matériel végétal	27
I.2.1. Historique du <i>Trigonella foenum-grecum L.</i>	27
I.2.2. Origine de la plante	27
I.2.3. Généralité sur le genre Fenugrec (<i>Trigonella foenum-grecum L.</i>)	27
II. Piégeage des Rhizobiums	28
II.1. Germination aseptique des graines	28
II.2. Isolement des Rhizobiums	30
II.2.1. Stérilisation des nodules	30
II.2.2. Ecrasement des nodules	30
II.2.3. Isolement de souches de <i>Rhizobium</i>	30
III. Les milieux de culture utilisés pour la croissance des <i>Rhizobiums</i>	
III.1. Les caractères culturaux	31
III.1.1. Milieu liquide	31
a. Milieu YMB	31
III.1.2. Milieu solide	31
a. Milieu YMA-RC	31
b. Milieu YMA	31
III.2. Purification des rhizobiums et Conservation des isolats	31
IV. Test physiologique	32
IV.1. Effet de la température	33
IV.2. Effet de la salinité	33
IV.3. Effet de pH	33
V. Tests biochimiques	33
V.1. La source de carbone	33
V.2. La source d'azote	33
VI. Analyse statistique	33
Résultats et Discussion	
I. Caractérisation culturaux	34
I. 1. Croissance sur YMA. RC	34
I.2. Croissance sur YMA	34
II. Caractérisation biochimique	35
II.1. Utilisation des sources de carbone	35
II.2. Utilisation des sources d'azote	36
III. Caractérisation physiologique	38
III.1. Effet de pH	38
III.2. Effet de salinité	39
III.3. Effet de température	40
VI- Biodiversité des isolats	41
Conclusion générale	44
Références bibliographiques	46
Annexes	51

Liste des tableaux

Tableau N^o	Titre	Page
01	Exemples des différents types de micro-organismes libres fixateurs d'azote.	8
02	Exemples des différents types de micro-organismes symbiotiques fixateurs d'azote.	9
03	Comparaison entre un nodule déterminé et un nodule indéterminé.	19
04	Les souches et les isolats utilisés dans cette étude	32
05	ANOVA à deux facteurs contrôlés.	40
06	Effet température sur les isolats.	41
07	Matrice des corrélations (coefficient de PERSON) entre les isolats et les souches de références.	42

Listes des figures

Figure	Titre	page
01	Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres	5
02	Schéma globale du processus d'infection jusqu'à la formation de nodule	14
03	Structure de quelques flavonoïdes présents dans les exsudats de plantes hôtes	16
04	Structure des nodules déterminés et un nodule indéterminé	20
05	La nitrogénase	22
06	La carte de la localisation géographique d El Hammamet -Tébessa-	26
07	Photo du site de prélèvements des sols El Hammamet Tébessa.	26
08	Les graines de la plante Fenugrec.	28
09	Germination aseptique des graines de <i>Trigonella</i> .	28
10	Piégeage des Rhizobiums par les plants de <i>Trigonella</i> cultivés.	29
11	Ensemencement par la technique des quatre cadrans.	30
12	Aspect morphologique d'isolat sur milieu YMA.RC.	34
13	Croissance des isolats et des souches des références sur le milieu YMA.	35
14	Utilisation des sources de carbone par les isolats et les souches de références.	36
15	Utilisation de la source d'azote par les isolats et les souches de références.	37
16	Effet de pH sur la croissance des isolats et les souches de références.	38
17	Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des isolats et les souches de références.	39
18	Classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références.	43

Liste des symboles

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. Nov
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ANOVA	Analyse de la variance
BNL	Bactéries nodulant les légumineuses
C	Carbone
CAH	Classification hiérarchique ascendante
CH₄	Méthane
CHS	Chalcone synthase
CO₂	Dioxyde de carbone
Cm	Centimètre
DO	Densité optique
Fix	Gène fixateur d'azote
GOGAT	Glutamine oxoglutarate aminotransférase
GS	Glutamine synthase
H₂NO₃	Acide nitrique
HgCl₂	Chlorure de Mercure
K	Kilogramme
KD	Kilo Dalton
LOS	Lipo-oligosaccharides
M	Mol
Mo	Molybdène
N	Azote
N₂	di azote
N₂O	Oxyde d'azote
NO₃-	Nitrates
N/ha	Azote/ Hécтар
NH₄⁺	Ammonium
NH₃	Ammoniac
nif	Nitrogen fixation = gène de fixation d'azote
nifD	Nitrogénase molybdène-fer et chaîne protéine
nifH	Nitrogénase protéines de fer
nifA	Activateur de la transcription
nM	Nanomol
nm	Nanomètre
nod	Gène de régulation de nodulation
Nod	Protéine régulatrice de nodulation
NO₃	Nitrates
NO₂	Nitrites
RC	Rouge Congo
Tr	Isolats de <i>Foenum grecum</i> <i>Trigonella</i> L.
YMA	Yeast Mannitol agar
YMB	Yeast Mannitol broth

Introduction

Introduction

La famille des légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme on compte 475 genres et environ 16400 espèces, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales (Moulin et *al*, 2001). L'intérêt des légumineuses est directement lié à la capacité de nombre d'entre elles d'établir une association symbiotique spécifique avec des bactéries (BNL) (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le genre *Fenugrec* (*Trigonella foenum-grecum L.*) est une plante herbacée (Mulot, 2005) annuelle ou vivaces de la famille des Fabaceae. Ce genre contient environ quatre-vingts espèces, de région méditerranéenne, et aujourd'hui il pousse dans le monde entier et particulièrement en l'Inde, l'Egypte, la Chine et l'Amérique (Burnie et *al*, 2006).

La symbiose *Rhizobium*- légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. Après les mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, la bactérie induit chez la plante la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieure du quel la bactérie se différencie en bacteroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacune des deux partenaires (Pelmout, 1993).

En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connus pour leur capacité de fixer l'azote atmosphérique dans des structures spécialisées qui sont les nodules. Les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacter*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Ralstonia* ainsi que certaines *protéobactéries*, forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes des légumineuses (Vilain, 1997).

Notre travail commence par un simple piégeage des *rhizobiums* nodulant la légumineuses médicinales du genre Fenugrec dans l'objectif de caractériser les souches bactériennes, symbiotiques et fixatrices d'azote, les isolats sont caractérisés par une étude phénotypique, suivi par une analyse statistique afin de cerner la position taxonomique de nos isolats on les comparants avec des souches de références dont leurs position taxonomiques est déjà établis.

Chapitre I :

Revue

bibliographique

I. fixation de l'azote

I.1. L'azote

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes. Ce nom est paradoxal, d'ailleurs : il vient du préfixe « a- » Privatif et du radical grec « ζωτ » (zoot) vivant - alors que l'azote est nécessaire à la vie (Pujic et Normand, 2009).

La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone CO₂ et du méthane CH₄ à travers les processus de la respiration et de la fermentation reliés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N) (Newton, 1998).

L'azote révèle comme l'agent principal de la croissance des végétaux (Gautier, 1993). La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de di azote (N₂) atmosphérique (Péret, 2007), un gaz incolore et inodore. L'azote est un facteur limitant majeur des productions végétales (Renier, 2008), et agricole (Wade et Krasova, 1998).

Chez les végétaux, on le rencontre sous formes minérales ou organiques (Claude et al, 2011). Si, sous forme minérale, l'azote est représenté par les nitrates, l'ammoniac et quelquefois les nitrites, la majeure partie de cet élément est retrouvée sous forme organique dans des molécules de complexité variable (Hopkins, 2003).

Nous pouvons aussi dans le cas de nutrition azotée, distinguer des organismes autotrophes et des organismes hétérotrophes. Les premiers sont capables d'exploiter l'azote inorganique, tandis que les organismes hétérotrophes sont dépendants de l'azote organique (Nultsch, 1998).

En effet, l'azote s'unit, dans les feuilles et dans les racines (Soltner, 2005), aux acides dérivés des glucides avec lesquels il forme les acides aminés, éléments constitutifs des protéines; constituant essentiel du cytoplasme et de ses inclusions (chloroplastes, mitochondries, ADN du noyau...) (Madigan et al, 2007), aux acides nucléiques, enzymes et les cofacteurs (Tortora et al, 2003), La transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac repose sur le pouvoir des bactéries à réduire le di azote (Hopkins, 2003).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone (Calvet, 2003), stimule le développement et l'activité racinaire, favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Bado, 2003), il est essentiel pour la synthèse des

enzymes de la photosynthèse (Lamaze et col, 1990). Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) (Hageman, 1984). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Bado, 2003).

La concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 7% sur une base de matière sèche (Parent, 1999). Et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif (floraison), L'insuffisance ou la carence de cet élément se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourte et *al*, 2005). Les feuilles matures entrent sénescence puisque leur azote est redirigé vers les feuilles croissantes. S'il y a excès, l'élongation des tiges est favorisée au détriment de la maturation et le développement racinaire est inhibé, pouvant mener à un approvisionnement inadéquat en eau et en éléments minéraux (Parent, 1999).

I.2. Les sources d'azote du sol

Lors de l'exposition des ions, il a déjà été indiqué que les plantes sont autotrophes pour l'azote. Elle le prélève dans le sol de préférence sous forme d'ions NO_3^- (Nultsch, 1998), le sol étant la première source d'azote utilisée par les plantes (Newton, 1998), que l'on trouve sous plusieurs formes ne provient pas de la dégradation de roches mais de autres sources :

- a. une source atmosphérique :** l'azote gazeux ou di oxyde d'azote N_2 , qui constitue les 4/5 de l'atmosphère, mélangé à l'oxygène. C'est la source primordiale d'azote du sol, qui s'y incorporé
 - Par les orages synthétisant, à partir de ce gaz, de l'acide nitrique H_2NO_3 , que les pluies entraineront dans la terre où il évoluera.
 - Par les bactéries fixatrices d'azotes libres ou associées à des plantes, ces bactéries l'utiliseront pour la synthèse de leur protéine, dont se nourriront à leur tour les plantes (Soltner, 2005).

- b. une source organique :** l'azote incorporé dans les matières organiques végétal ou animales. Cette source dérive évidemment de la première. Les bactéries qui dégradent les matières organiques libèrent l'azote sous des formes assimilables par les plantes (Nultsch, 1998).

- c. une source synthétique :** l'azote des engrais azotés synthétisés à partir de l'azote de l'aire mais avec forte dépense d'énergie, celle du pétrole (Vilain, 1997).

Il s'agit des engrais azotés dérivant de la synthèse de l'ammoniac NH_3 dans lequel N vient de l'air, et H des hydrocarbures pétroliers si, au niveau d'une parcelle, les fumures azotées à base d'engrais de synthèse peuvent sembler importantes (de 100 à 500 Kg de N/ha), au niveau d'un territoire, englobant de vastes surfaces non fertilisées artificiellement, les sources naturelles d'azote sont de loin les plus importantes (Soltner, 2005).

I.3. L'azote minéral

L'azote minéral présent dans un petit volume de terre peut provenir de la minéralisation in situ, d'un transfert d'ion en phase liquide ou d'un apport d'engrais minéraux.

Il peut connaître différentes destinées :

- Être absorbé par les micro-organismes et les bêtes
- Être entraîné par l'eau (lessivages, remonté capillaire)
- Être volatilisé ou dénitrifié

La teneur en azote minéral à un instant est donc la résultante de ces phénomènes (Vilain, 1997).

I.4. Cycle d'azote

La fixation biologique de l'azote est l'une des fonctions accessoires les plus répandues dans le monde vivant (Renier, 2008). 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 (Hopkins, 2003), les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle d'azote (Domergues et al, 1998).

Le cycle d'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumise de nouveau dans la nature (Torche, 2006). Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou, parfois d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Lowenfelds et Lewis, 2006).

Mais seul un nombre réduit des genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphérique (Geneves, 1990). Par la symbiose entre les bactéries réductrices de l'azote atmosphérique, une grande partie des légumineuses.

A l'échelle mondiale, la fixation biologique annuelle de l'azote est estimée au double de l'utilisation mondiale des engrais. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Newton, 1998).

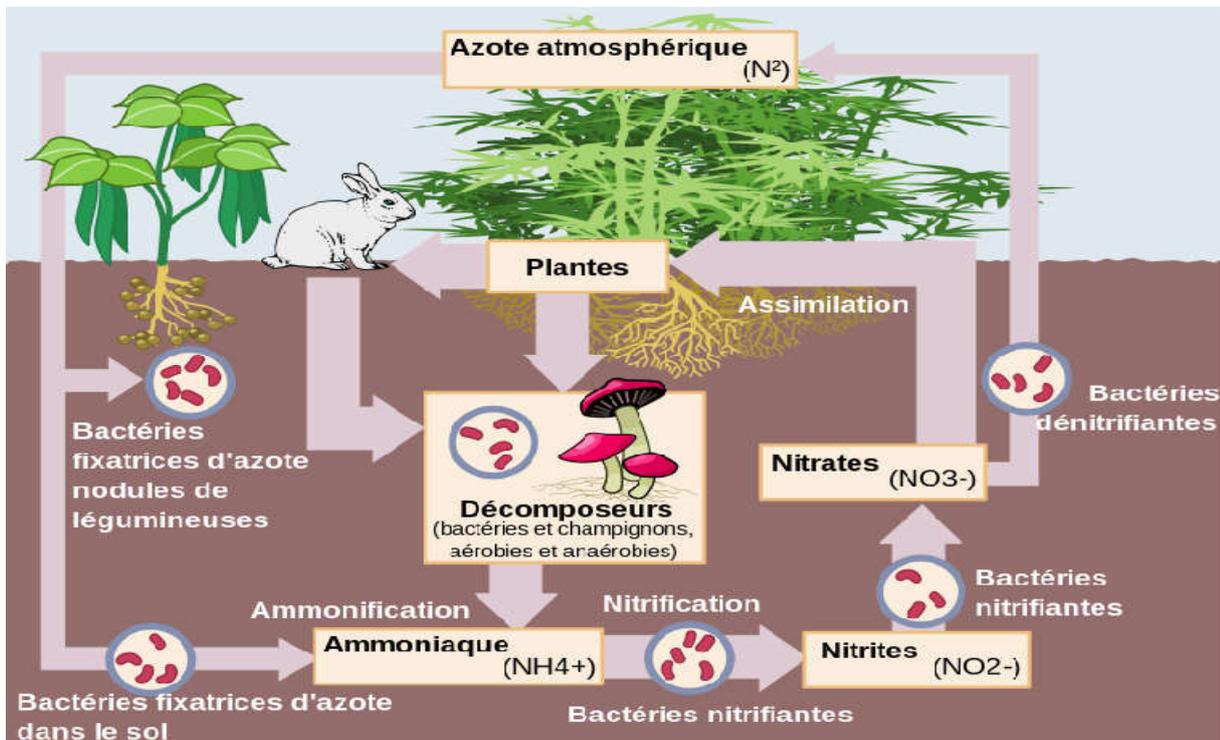


Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic, 2009).

L'azote se déplace sans cesse sa forme minérale et sa forme organique.

Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des micro-organismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée ; et le cycle recommence (Saoudi, 2008), les trois principales étapes de ce cycle sont : l'ammonification, la nitrification et l'assimilation (Raven et al, 2007).

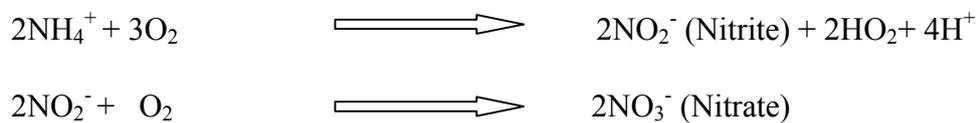
a. Ammonification

Un très grand nombre des bactéries et des champignons sont capable de transformer l'azote de la matière organique (Raven et al, 2007), aussi bien en condition aérobie qu'en anaérobie (Vale, 2006). L'ammonification est le processus inverse de la réaction d'assimilation de l'ammonium, soit la transformation d'azote organique en NH_4^+ , sous

l'action de micro-organisme hétérotrophes qui utilisent des substrats carbonés comme source d'énergie (Vale, 2006), et relèguent l'azote sous forme NH_4^+ (Quéguiner, 2005).

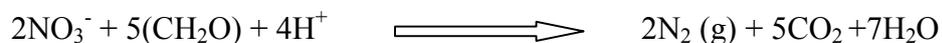
b. Nitrification

C'est la production de nitrites (NO_2^-) et de nitrates (NO_3^-) par oxydation des ions ammonium (NH_4^+). Au cours de la première étape de cette réaction, le genre *Nitrosomonas* oxyde les ions ammonium en nitrites. Dans la deuxième étape, des micro-organismes dont le genre *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates (Raven et al, 2007), la nitrification par des Bactéries aérobies ne peut se faire que dans les tous premiers centimètre du sol qui contient encore de l'oxygène (Legrose, 2007). La réaction en chaîne est de type (Emmanuel, 2007).



c. Dénitrification

Sont correspond à un retour vers l'atmosphère de l'azote sous sa forme moléculaire N_2 , N_2O (gaz à effet de serre qui contribuent à détruire la couche d'ozone dans la stratosphère) et NH_3 . Ce processus est commandé par une réaction de réduction de NO_3^- (Emmanuel, 2007), par l'intermédiaires des bactéries (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*) qui transfert la matière organique selon la réaction suivante (Soltner, 2005):



I.5. biologique de l'azote

Les microbiologistes du sol de la fin du siècle dernier (Berthelot et Beijerinck) ont mis en évidence la capacité de certaines micro-organismes à utiliser l'azote de l'air; certaines libre ou vivent en association plus ou moins étroite avec légumineuse (Vilain, 1997).

La fixation moléculaire d'azote peut s'opérer soit par un processus biologique naturel (appelé fixation biologique d'azote) ou non biologique (éclaircie, combustions, volcanisme), soit par un procédé artificiel de synthèse (production d'engrais chimiques).

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote parce qu'il ne possède pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes (Hopkins, 2003), simplement parce qu'il possède un complexe enzymatique qui catalyse la réduction de l'azote moléculaire, nommé nitrogénase (Nultsch, 1998).

La fixation biologique d'azote est une activité microbienne très importante. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphériques sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. En absence de fertilisation, elle est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger et al, 1996).

mais, un seul nombre réduit de genre bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère (Bado, 2002). Pour certains groupes de végétaux, l'association avec ce type de bactérie leur permet d'améliorer leur nutrition azotée (Svistoonoff, 2003).

I.6. Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimio-organotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Sbihi, 2008).

La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer de grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol, la réduction de l'azote en ammoniac est limitée par les quantités de glucides disponibles (Chabbi, 2010).

Tableau 1 : exemples des différents type de micro-organismes libres fixateurs d'azote (Roger et *al*, 1996).

Micro- organismes libres				
Aérobies	Hétérotrophes	Azotobacter <i>spp</i> : <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
		Beijerinckia indica ; <i>Azospirillum lipoferum</i>		
	Phototrophes : Cyanobactéries	Hétérocystées	Nostoc ; Anabaen ; Calothrix ; Tolypothrix	
		Homocystées	Trichodesmium ; Oscillatoria	
		Unicellulaires	Gloeotheca ; Gloeocapsa	
Anaérobies	Hétérotrophes	Clostridium pasteurianum ; Desulfovibrio vulgaris.		
		Desulfotomaculum <i>spp</i> ; Methanobacterium <i>spp</i> .		
	Phototrophes	Rhodospirillum rubrum ; Rhodobacter capsulata		
		Chromatium vinosum		

I.7. Les fixateur symbiotique

Les espèces fixatrices d'azote réellement symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. Les bactéries symbiotique appartiennent au genre rhizobium (Vilain, 1997) des actinomycètes (Frankia), bactérie filamenteuse (Ganry et Domergus, 1995), et des cyanobactéries (Dib, 2013).

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote. La forme la plus commune d'association symbiotique que provoque la formation sur la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules (Hopkins, 2003).

Tableau 2 : exemples des différents types de micro-organismes symbiotiques fixateurs d'azote (Roger et al, 1996).

Micro- organismes symbiotiques		
Légumineuses	A nodules racinaires	<i>Rhizobium meliloto</i>
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	A nodules caulinaires	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
Symbioses actinorhiziennes		<i>Frankia</i>
Symbioses à cyanobactéries	Azolla	<i>Anabaena azollae</i>
	Cycas	<i>Anabaena cycadeae</i>
	Lichens	<i>Nostoc</i>
	Mousses et hépatiques	<i>Nostoc</i>

a. Le genre *Rhizobium*

Le genre *rhizobium* regroupe des bactéries dites à croissance rapide (temps de génération inférieur à six heures), chimio-organotrophes, aérobies ou micro-aérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm), gram négatifs, non sporulant, on distingue deux formes : la forme végétative, et la forme bactéroïde (Perry et al, 2004; Somasegaran et Hoben, 1994). et comporte quatre espèces définies : *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium tropici*, et *rhizobium etli* (Segovia et al, 1993). Ce genre infecte principalement les légumineuses des régions tempérées (Blandreau, 1996).

Parmi les proches parents des *Rhizobium*, il faut citer diverses protéobactéries de la classe α telles que *Sphingomonas* et surtout, *Azotspirillum*; dans la classe β on trouve des *Alcaligenes*, des *Herbaspirillum* et des *Burkholderia* (Sivistoonoff, 2003); la classe γ est représentée par diverses entérobactéries (Blandreau, 1996).

b. Le genre *Bradyrhizobium*

L'identification de souches à croissance lente remonte à 1932 mais leur classification en un seul genre *Bradyrhizobium* a été établie par Jordan en 1982 (El-Hilali, 2006). Depuis sa caractérisation ce genre ne comprenait qu'une seule espèce définie *Bradyrhizobium japonicum* nodulant le soja (*Glycine max*) et le siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Récemment deux nouvelles espèces, *Bradyrhizobium elkanii* (Kluykendalet al, 1992) et *Bradyrhizobium liaoningensis* (Xu et al, 1995) ont été définies. Les bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* infectent de nombreuses légumineuses tropicales

La caractérisation de différentes souches de *Bradyrhizobium* par la comparaison de plusieurs techniques moléculaires a révélé l'existence de 11 génotypes différents dont trois correspondent aux souches reconnues, alors que les 8 génotypes restants sont très distincts (Dommergues et al, 1998).

c. Le genre *Mesorhizobium*

Les *Rhizobium* étant très hétérogène, plusieurs branches divergentes ont été taxonomiquement identifiées. Donc la description d'un troisième genre qui a été appelé *Mesorhizobium* et où seront regroupées au moins six espèces : *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum* (De lajudie et al, 1994), *Mesorhizobium tianshanense*, *Mesorhizobium plurifarium*, *Mesorhizobium huakii* (Maougal, 2004), *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al, 1982)

d. Le genre *Azorhizobium*

Comprend une seule espèce définie, *Azorhizobium caulinodans*, qui nodule les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al, 1988). Le genre *Azorhizobium* est taxonomiquement éloigné des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*, mais extrêmement proche des bactéries aquatiques appartenant aux genres *Xanthobacter* et *Aquabacter*. Ainsi, les *Azorhizobium* seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des *Rhizobium* du sol (peut être des *Sinorhizobium*) des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifiques de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique *Sesbania rostrata*. Contrairement aux bactéries du genre *Sinorhizobium* qui forment des nodules effectifs sur les racines de nombreuses espèces de *Sesbania*, les *Azorhizobium* ne fixent l'azote qu'avec *Sesbania rostrata* (Wade, 1998).

e. Le genre *Sinorhizobium*

Le genre *Sinorhizobium* est très proche du genre *Agrobacterium* qui a été classé en dehors des *Rhizobiacées* en raison de ses caractéristiques pathogènes (Sivistoonoff, 2003), il est actuellement constitué d quatre espèces :

- *Sinorhizobium meliloti*, proposée initialement par Dangeard (1926) et isolée à partir des espèces *Melilotus*, *Medicago* et *Trigonella* (Jordan, 1984).
- *Siorhizobium Saheli* et *Siorhizobium teranga*, isolées respectivement à partir d'*Acacia* et *Sesbani*
- *Siorhizobium fredii*, isolée initialement de *Glycine max*, *Vigna unguiculata* et *Cajanus cajan*, mais aussi d'autres légumineuses (Scholla et Elkan, 1984).

D'autres nouvelles espèces appartenant à ce genre ont été caractérisatées au cours des dix dernières années, *S. medicae* (Rome et al, 1996), *S. Kostense* et *S. arboris* (Nick et al, 1999), *S. Kummerwiae*, *S. morolense* et *S. americanum* (El-hilali, 2006).

II. La symbioses *Rhizobium*/ Légumineuse

II.1. La symbiose

Certaines plantes hébergent dans leurs tissus des bactéries qui assimilent l'azote de l'air. La plante profite du travail fait par les bactéries, celles-ci trouvent protection et compensation du côté de la plante. Un tel échange de bons procédés s'appelle symbiose (Pelmout, 1993).

La symbiose, qui signifie (vivant ensemble), est un terme générale s'appliquant aux relations étroites (Raven et al, 2014); permanente et obligatoire (Mioulane, 2014) permet à deux espèces différentes de vivre ensemble, chacune tirant profit de l'autre (Sablounière, 2006).

Certaines relation symbiotiques, typiquement responsables de maladies, sont parasites (Raven et al, 2014).

Toutefois, la limite entre le parasitisme et la symbiose n'est pas toujours très nette, car le bénéfice que tire de la symbiose l'un ou l'autre des deux partenaires n'est pas évident dans tous les cas. Quoi qu'il en soit, la symbiose n'occasionne ni dommage durable ni la mort de l'un des partenaires, ce qui par contre, est la règle pour le parasitisme. Très souvent la symbiose s'établit entre un partenaire autotrophe et un partenaire hétérotrophe (Nultsch, 1998).

Il y a deux types de la symbiose Endo- et Ecto selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo- ou ecto-symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ecto-symbiose; sinon, on parle d'end-osymbiose. L'endosymbiose peut être intra- ou extracellulaire (Broughton, 2000).

II.1.1. La symbiose Rhizobium- légumineuses

Lors de l'association Rhizobium/ racines de plante légumineuses, les bactéries pénètrent dans les racines par le canal des poils absorbantes y transforment et induisent une transformation des tissus de la plante à l'origine des fameux nodules. Cette association n'est pas obligatoire, car les bactéries peuvent être cultivées séparément et la plante peut pousser sans ses bactéries (Pelmout, 1993).

L'existence de cette association permet à la plante d'acquérir la faculté de fixer directement l'azote atmosphérique, ce que ne peuvent pas faire les autres plantes supérieures. La fixation de l'azote atmosphérique s'effectue au niveau de la rhizosphère (Macheix et *al*, 2005) volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes qui se caractérise par des compositions chimiques et biologiques différentes de celles du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines (Alami et *al*, 1999).

Cette symbiose est relativement répandue dans la nature. Elles ont une grande importance économique pour l'homme (Pelmout, 1993).

II.1.2. Les spécificités de la symbiose

Les bactéries qui peuvent également vivre librement dans le sol (mais ne fixent pas l'azote dans ce cas), reconnaissent leur hôte grâce à des protéines signal (lectines) (Dommergues et *al*, 1998), ces substances qui sont des protéines susceptibles de se fixer de façon réversible sur des sucres dans les graines; on les trouve aussi dans les tiges, les racines et aussi dans les sites où la nodulation démarre. Dès qu'elles entrent en contact avec un poil absorbant, certaines réactions sont déclenchées au niveau de l'hôte par des composés produits par les gènes nod du plasmide Sym activés par les dépôts racinaires (Nultsch, 1998).

Les gènes nod sont induits par le signal flavonoïdes excrétés par la racine des plantes hôtes, et cette induction mène à la production et à l'excrétion des signaux de nodulation qui permet la reconnaissance de la présence de la bactérie par sa plante hôte, les facteurs Nod (Simms, 2002).

II.2. L'infection et la nodulation

La symbiose entre une plante supérieure et des bactéries, donne lieu à la présence de nodosités racinaire (Nultsch, 1998). C'est à partir de la rhizosphère que certains *rhizobiums* vont infecter la racine et se multiplient aux dépens des exsudats et divers dépôts racinaires (Dommergues et *al*, 1998), un peu comme si les bactéries se faisaient reconnaître par un mot de passe avant de faire établir à l'avance leur chemin d'entrée selon leurs propres normes (Pelmont, 1993), ils reconnaissent leur hôte grâce à des protéine-signal (lectines) qui se situent sur la paroi externe des poils absorbants (Nultsch, 1998).

Lors de la pénétration par les poils absorbants, ceux-ci se courbent en crosse et leur plasmalemme s'invagine en doigt de gant pour former un canalicule tubulaire d'un diamètre de quelques microns, rempli d'un mucilage polysaccharidique d'origine végétale appelé le cordon d'infection. A la faveur d'une lyse localisée de la paroi, les bactéries colonisent ce cordon, qui croît progresse et se ramifie de cellule en cellule jusque dans le parenchyme cortical de la racine (Selosse, 2006). Les racine de la plante reprennent leurs divisions et édifient une nodosité (Dommergues et *al*, 1998).

La formation du nodule peut se résumer en trois étapes clés : le dialogue moléculaire, se mettant en place entre les deux partenaires symbiotiques, l'infection, correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la légumineuse, et le développement proprement dit du nodule (Renier, 2008).

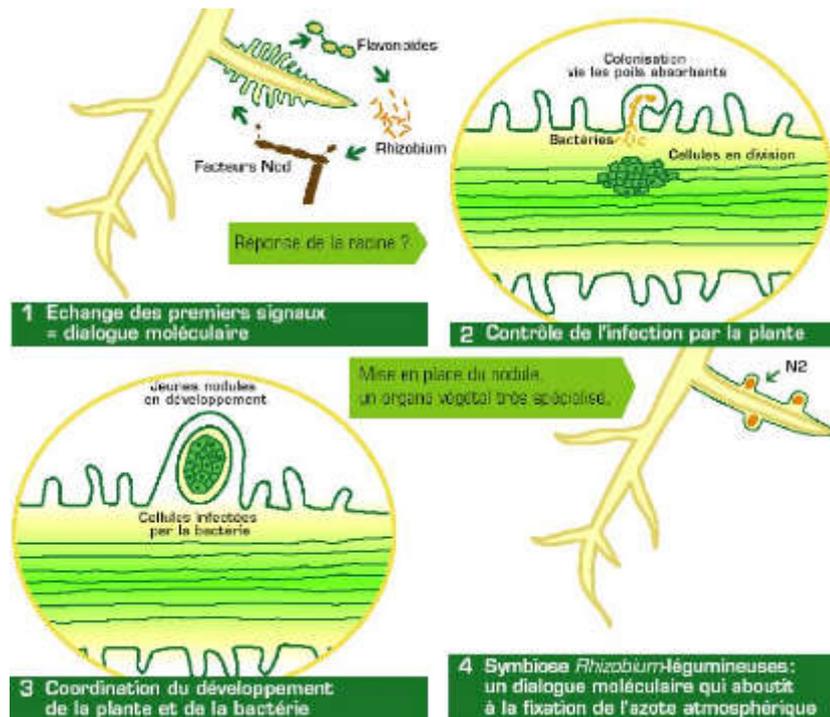


Figure 2 : Schéma globale du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule (Site 1).

II.3. Le dialogue moléculaire

La mise en place de structures mixtes, nécessite une reconnaissance et un développement conjoint entre les partenaires (Selosse, 2006). L'infection et la formation du nodule de légumineuse sont contrôlées par un dialogue moléculaire entre la bactérie symbiotique et la plante hôte. En présence de substances inductrices provenant des racines (flavonoïdes) (Dommergues *et al*, 1998). Ces substances attirent et activent les bactéries fixatrices d'azote autour des racines (Hynes et O'Connell, 1990), ils constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent l'expression du gène de régulation de la nodulation *nodD* de la bactérie et induisent le mécanisme du chimiotactisme des rhizobies (Kouakou, 2011). La reconnaissance d'une protéine régulatrice NodD donnée par un spectre particulier d'inducteurs racinaires détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique (Dommergues *et al*, 1998).

a. Les flavonoïdes

La nécessité de la composé phénolique (flavonoïdes inducteur) a été démontré dès 1986 dans le cas de l'interaction *luzerne/ Rhizobium meliloti* où une flavone, la lutéoline, est

efficace à des très faibles concentrations (de l'ordre de 10 nM) (Macheix et *al*, 2005). Les flavonoïdes sont des composés aromatiques, avec un squelette en C15, diversifiés en forme et en fonction avec l'évolution des plantes. Les principales sous-classes, déterminées selon les caractéristiques structurales des composés sont : les chalcone, les flavones (lutéoline) et flavanones (naringénine), les isoflavones (daidzéine) et isoflavanes (figure 02) et des formes polymérisées telles que les proanthocyanidines (Renier, 2008 ; Pelmout, 1993).

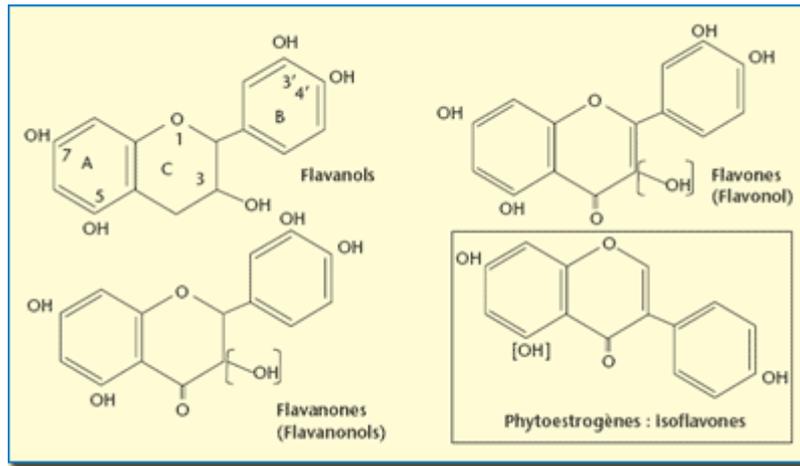


Figure 3 : Structure de quelques flavonoïdes présents dans les exsudats de plantes hôtes (Bruneton, 1993).

Les exsudats des racines de légumineuse, comme ceux de nombreuses plantes, renferment une grande diversité des flavonoïdes (plus de 4000). Ces substances attirent les rhizobiums par chimiotactisme (Dommergues et *al*, 1998). En condition limitantes de nutrition nitraté, il y a stimulation de l'expression des gènes de l'enzyme chalcone synthase (CHS) et augmentation de la teneur en flavonoïdes et isoflavonoïdes. Il en résulte alors une augmentation de la capacité de nodulation qui en permettant la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique, compenserait la faible nutrition azotée à partir du sol (Macheix et *al*, 2005).

Le rôle important des flavonoïdes dans le dialogue moléculaire est leur capacité à activer les gènes bactériens *nod* dont les produits vont faciliter le mécanisme infectieux (Pelmout, 1993).

b. Les facteur Nod

L'existence d'un facteurs de nodulation (dits facteur Nod) a été montrée la première fois chez *Rhizobium meliloti* (Pelmout, 1993). sont des lipo-oligosaccharides (LCO) constitué d'un squelette de moins de 20 résidus de N-acétyl-glucosamine réunies par des liaisons β (1-4) (Spaink et al, 1992), la nature de l'acide gras et varie avec la souche de rhizobium considérée (Dommergues et al, 1998). Sur lesquels sont fixés divers radicaux, ont été purifiés à partir de bactéries hyper-productrices.

La symbiose *Rhizobium*/ Légumineuse se met en place lorsque la bactérie forme des facteurs Nod qui vont être reconnus par la plante (Macheix et al, 2005), ils sont capables à concentration très faible (10^{-12} M, soit une molécule par cellule racinaire) (Denarié, 2000) d'induire, en l'absence de toute bactérie, la réponse de la racine : courbure du poil absorbant, formation du cordon d'infection et d'une nodosité. Le programme morphogénétique est donc entièrement codé par la plante, mais induit par le facteur Nod de la bactérie. Le facteur Nod se fixent sur le plasmalemmes végétal et entraînent des dépolarisations et des flux ioniques : influx de Ca^{++} puis efflux de Cl^- , compensés plus tard par un efflux de K^+ . Bien qu'on ait des preuves indirectes de leur existence, les récepteurs des facteurs Nod restent inconnus (Selosse, 2006).

La structure des facteurs Nod, qui est contrôlée par un ensemble des gènes *nod* dits spécifique, détermine un deuxième niveau de spécificité (Dommergues et al, 1998).

c. Les gènes nod

Les gènes de nodulation ou gènes *nod*, au nombre de 20 à 30, sont portés par un plasmide présentant jusqu'à 25% du génome bactérien, mais sont chromosomiques chez *Bradyrhizobium*. Ils sont groupés en opérons contrôlés par une séquence d'activation (Selosse, 2006); ils sont nécessaires à la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de nodulation (Pelmout, 1993).

La plupart des gènes bactériennes *nod* ne sont pas transcrit tant qu'il s n'ont pas été activés par l'action conjointe de la protéine NodD, produite de manière constitutive par le gène bactérien *nodD* et les flavonoïdes exsudés dans la rhizosphère par les racines des plantes (Macheix et al, 2005).

Les gènes *nod* communs (*nod A*, *B*, *C*) sont les gènes fonctionnellement identiques (Schultze et al, 1994), ils sont interchangeable entre les différentes espèces (Pelmout, 1993).

Il permet la synthèse du squelette chitineux (protéine *nodC*) la désacétylation de l'azote de l'extrémité non réductrice (protéine *nodB*) et son acylation par un acide gras (protéine *nodA*) (Selosse, 2006).

Le gène *nod D* est associé étroitement aux gènes communs : ses produits interagissent avec les molécules-sigaux de la plante (flavonoïdes et iso flavonoïdes), activent la transcription des autres gènes *nod* inductibles et pourraient, en outre jouer un rôle dans la spécificité (Dommergues et al, 1998).

Les gènes *nod* accessoires permettent quant à eux la biosynthèse et l'ajout de radicaux variés (sulfate, acides gras, hexoses...) sur l'oligosaccharide. Les gènes *nodH*, *nodP* et *nodQ*, qui permettent la sulfatation des facteurs Nod (Pelmout, 1993). Selon le ou les type(s) de facteurs Nod qu'elle émet, une bactérie peut ou non être reconnue par une légumineuse donnée. Le dialogue moléculaire implique donc des substances diffusibles et des récepteurs très sensibles. Tout en mettant en place les nodosités (Selosse, 2006).

II.4. L'infection

L'infection débute juste après que le rhizobium s'adsorbe par chimiotactisme au poil racinaire (Hirsch, 1992).Après avoir pénétration, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (Hopkins, 1999).

Au bout du cordon d'infection, les bactéries deviennent des batéroïdes (augmentation de leur taille et déformation) (Selosse, 2006), alors que les tissus de la plante développent les nodules. Des échanges de matériaux carbonés et azotés s'établissent alors entre les deux parties (Pelmout, 1993).

Il existe trois modalités d'infection que distincts. Par vois intracellulaire: dans ce cas, la pénétration du bactérie dans le poil absorbant provoque la formation d'un Cordon d'infection contenant les bactéries disposées en file, puis les bactéries sont libérés dans les cellules de l'hôte suivant un mécanisme se rapprochant de l'endocytose. Les bactéries subissent alors des transformations morphologiques et leur enzyme d'assimilation de l'ammonium sot réprimées et ils commencent à fixer N₂, ou bien l'infection par voie inter cellulaire. Dans ce cas, l'infection s'effectue directement par pénétration intercellulaire au niveau des cellulesdu rhizoderme (appelé epiderm en anglais) (Dommergues et al, 1998).

II.5. Le développement des nodules

Le processus d'infection intracellulaire, impliquant l'infection de poil racinaire. le première signe du processus symbiotique est une déformation des poils absorbants, induite par des molécules de nature inconnue secrétées par la Frankia lors du contact avec les racines de la plantes hôte (Dommergues et *al*, 1998).

Les hyphes pénètrent ensuite dans la zone de courbure d'un poil racinaire, puis sont encapsulés dans une structure équivalente au cordon d'infection des légumineuses. Suite, des divisions dans le cortex de la racine infectée, une structure appelée prénodule. Ce prénodule contient larges cellules corticales infectées par Rhizobium qui fixent l'azote (Benabdoun et *al*, 2012). Le primordiales nodulaire est ensuite initié à partir de divisions observées dans e péricycle de la racine (Selosse, 2006), en face d'un pôle de protoxylème, dans une zone proche du prénodule. Les hyphes vont ensuite progresser du prénodule vers les cellules corticales du lobe nodulaire en formation.

Un nodule mature est constitué de plusieurs lobes nodulaires (Macheix et *al*, 2005), chacun possédant une vascularisation centrale, et un cortex organisé en plusieurs zone: zone méristimatique, d'infection et zone de fixation d'azote ; dans les nodules âgés, une zone de sénescence est observée. Des couches de cellule non infectées et induisent une compartimentation du lobe nodulaire (Pelmout, 1993).

Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristimatique est persistante ce qui traduit par une forme allongée (Dommergues et *al*, 1998).

Tableau 03: comparaison entre un nodule déterminé et un nodule indéterminé (Dommergues et al, 1998).

Type de nodule	Indéterminé	Détermine
Site de la première division cellulaire	Cortex interne	Cortex externe
Croissance des nodules	Division cellulaire méristème persistant	Expansion et / ou division cellules
Cordon d'infection	Large	Etroit
Transport	Amides	Urédes
Induction des gènes nod	Flavones Flavanones	Isoflavones

II.6. Différentes zones du nodule

L'un des meilleures études structurales sur la différenciation de *Rhizobium meliloti* et la formation des nodules a été publiée par le groupe Truchet à Toulous. La différenciation en nodule forme deux tissus principaux:

- Une partie centrale où se déversent les cellules bactériennes. Celles-ci augmentent fortement de taille et se transforment en bactéroïdes, séparés du cytoplasme végétal par une membrane spéciale.
- Une partie périphérique qui contribue à donner au nodule sa forme ballonnée ou en masse .Le nodule comporte quatre zones, qui sont évoquées par le croquis (pelmout, 1993).
 - a) **La zone méristématique** (zone 1) formé de petites cellules non contaminées par les rhizobia et qui assurent la croissance de la nodosité.
 - b) **La zone de préfixation** (zone 2), qui comprend la zone d'invasion (zone de pénétration des cordons d'infection, où les cellules expriment les gènes des nodulines précoces), la partie proximale de la zone d'invasion où les *Rhizobiums* commencent à être relâchés du cordon d'infection et la zone de préfixation où les cellules de la plante hôte contenant les astéroïdes sont plus différenciés que dans la zone d'invasion (Dommergues et al,1998).

Dans la région de la transition entre 2et3, les cellules végétales apparaissent fortement chargées en amyloplast (graine d'amidon), qui délimite la zone symbiotique

- c) **La zone de fixation** (zone 3) cette zone est le siège de la fixation de l'azote dans les cellules. Elle contient un très grand nombre de bactéries.
- d) **La zone de dégénérescence** (zone 4), les cellules de la plante hôte dégèrent. Cette zone apparaît normalement au bout de 5 semaines après l'infection initiale (Pelmout, 1993).

On distingue deux types de nodules: les nodules indéterminés, qui comportent un méristème nodulaire persistant, et les nodules déterminés, chez lesquels ce méristème n'existe pas (par méristème on entend ici un ensemble de cellules en voie de division qui se perpétue tel quel et non simplement un ensemble de cellules qui se divisent activement pendant un certain temps pour se différencier ultérieurement). Le type de nodule formé est déterminé par la plante hôte et non par la souche de rhizobium (Dommergues et al, 1998).

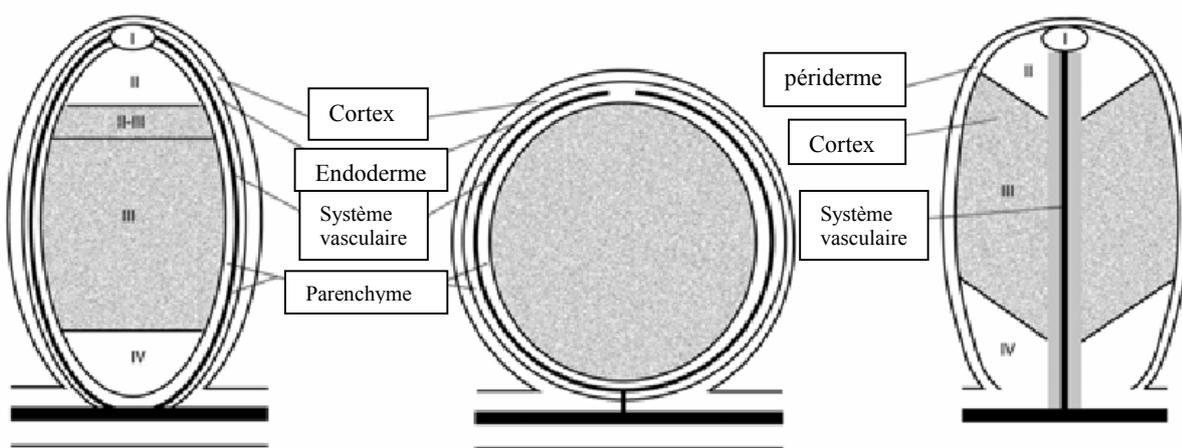


Figure 4: Structure des nodules déterminés et un nodule indéterminé (Pawlowski et Bisseling, 1996).

Les nodules de Légumineuses présentent une structure similaire à celle d'une tige avec les tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par les *Rhizobia*. De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve :

- le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses
- le cortex moyen
- les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle
- le cortex interne formé de une à trois couches de cellules

- le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les rhizobia et des cellules non infectées.

II.7. Biochimie de la fixation

II.7.1. La nitrogénase

La nitrogénase (*nif*, pour la fixation de l'azote) enzyme responsable de la réduction de l'azote moléculaire (Militao, 2004), est présent dans une grande variété de bactéries du sol et ne fonctionne que dans des conditions anaérobies, car le système enzymatique est inactive de manière irréversible par l'oxygène. La réaction générale de la formation de NH₃ peut s'écrire de la réaction suivante (Hallard, 2013):



La nitrogénase est en réalité un complexe enzymatique formé de deux protéines: la première appelée composant 1 (la Fe- Mo- protéine), contient du fer et des molybdènes et composant 2 (la Fe- protéine) ne contient que du fer. Ces composants peuvent être dénommés respectivement dinitrgénase et dinitrogénase réductase (Hagman et Burris, 1978).

- Composant 1 qui fournit des électrons des électrons de haut pouvoir réducteur, est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ codé par les gènes *nifD* et *nifK*, c'est la composante principale du système de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4 Fe- 4S) relié entre eux deux par deux, ce tétramère est associé à un facteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire N₂ en NH₃ (Leclerc, 1995; Hopkins, 2003).
- Composant 2 c'est le donneur d'électrons, c'est un homodimère codé par le gène *nifH* (dekkak, 2010), elle contient du fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc, 1995; Hopkins, 2003). Elle ne peut transporter qu'un electron à la fois. Ainsi, on pense qu'elle sert probablement à l'emmagasinage temporaire de l'électron.

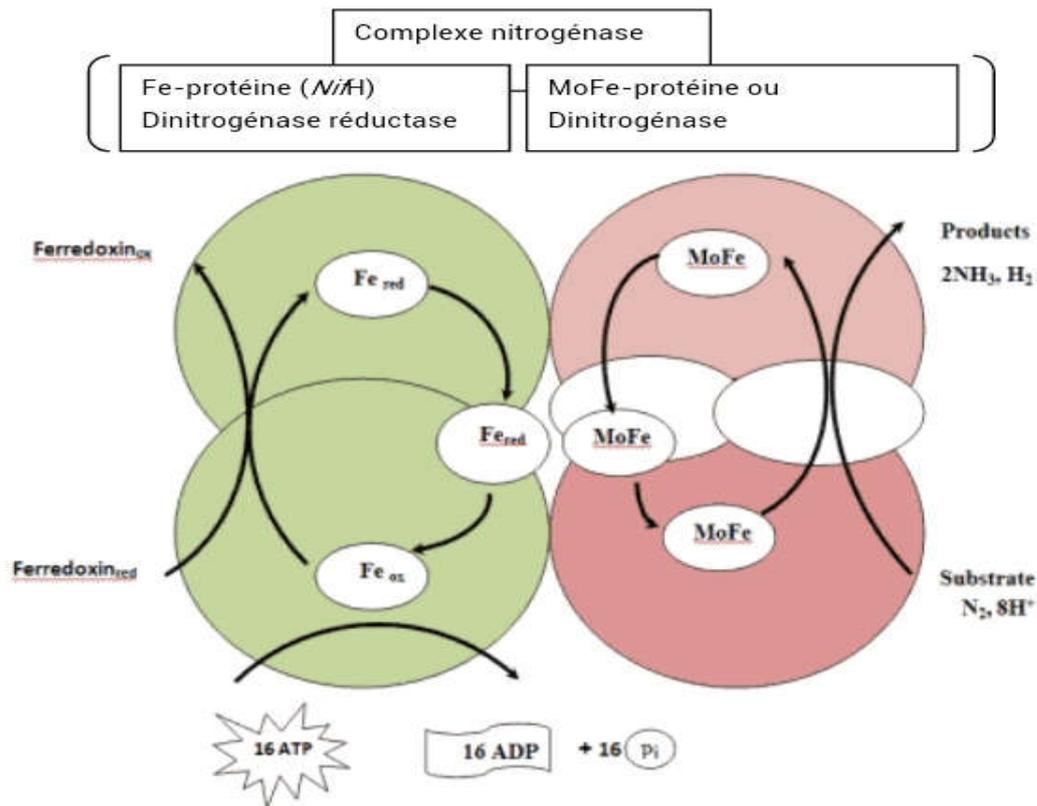


Figure 5: La nitrogénase (Yann, 2006)

II.7.2. La leghémoglobine

La composante de la protection de la nitrogénase (extrêmement sensible à l'inactivation par O_2) est la présence dans les cellules infectées de leghémoglobine (Dommergues et *al*, 1998), noduline particulièrement affine pour l'oxygène, qui réduit la tension d' O_2 dans la nodule, elle interviendrait aussi en facilitant le transport de l' O_2 aux batéroïdes (Dommergues et *al*, 1998).

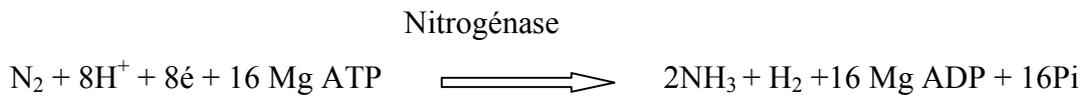
C'est une chromoprotéine formée de deux sous unités, de structure comparable aux globines ou de mycoglobine (Tourte et *al*, 2005; Hopkin, 2003; Madigan et *al*, 2007). Synthétisée par la plante hôte, et peut constituer jusqu'à 30% des protéines de la cellule hôte (Hopkin, 2003).

Pour protéger la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène, la leghémoglobine de coloration rouge due à la présence du fer présente des similitudes avec les l'hémoglobine animales. Elle permet au *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule (Kundu, 2003).

II.8. Processus de fixation de l'azote

Le processus de fixation biologique de l'azote consiste dans la réduction de l'azote atmosphérique (N₂) sous la forme ammoniacale, forme utilisable par la plante (Dommergues *et al*, 1998).

La réduction d'une molécule de l'azote exige que la dinitrogénase obtienne 8 électrons de la dinitrogénase réduction. Le cycle de transfert d'électrons doit donc se répéter 8 fois étant donné que chaque électron nécessite l'hydrolyse de deux molécules d'ATP, il faut donc 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule de l'azote (Dekak, 2010).



Le processus de réduction de l'azote est relativement lent à cause des nombreuses associations et dissociation. Pour maintenir une vitesse de fixation raisonnable, la teneur du processus est compensée par une teneur élevée en nitrogénase des cellules bactériennes (Dommergues *et al*, 1998).

En générale il existe deux enzymes qui facilitent la fixation biologique de l'azote atmosphérique les bactéries de nodule du faite que l'ammoniac produit par la premier réaction (EI) est assimilée par l'action des deux enzymes le glutamate synthétase (GS) et la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT), selon les deux équations (Ludwig, 1980).



II.9. Les gènes de la fixation

Les génomes des partenaires doivent donc contenir tous les gènes nécessaires à l'établissement de la symbiose. Dans l'association, certains gènes sont réprimés tandis que d'autres sont activés. Certains gènes s'expriment uniquement dans la symbiose (Selosse, 2006).

La plupart des gènes bactériens *nif* se trouvent usuellement sur des plasmides (Macheix et al, 2005). La présence d'au moins un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (*pSym*) est une singularité intéressante dans tous les souches de *Rhizobium meliloti* (Pelmout, 1993). Les gènes *nif* et *fix* y sont groupés selon une disposition comparable d'un plasmide à l'autre (Nultsch, 1998).

La génétique moléculaire de *Rhizobium* a également permis d'identifier les gènes majeurs (*nif* et *fix*) impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote et dans sa régulation par l'oxygène (Maougal, 2004).

II.9.1. Les gènes *nif*

Le système enzymatique de la fixation bactérienne de l'azote ainsi que la formation des nodosités sont codés par les gènes du groupe *nif* localisés sur le plasmide *sym* (Nultsch, 1998). sont des gènes codant pour les trois sous unités hautement conservées de la nitrogénase (réduit l'azote moléculaire en ammoniac), ainsi que pour les protéines auxiliaires nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase (Sebihi, 2008).

La transcription des ces gènes n'a lieu que dans des conditions physiologique bien définies qui dépendent des propriétés des bactéries concernées. Les signaux majeurs intervenant dans cette régulation sont l'ammoniac et l'oxygène (Saoudi, 2008). Les produits des gènes *nifA* et *nifL* contrôlent les opérons des autres gènes *nif*: le produit des gènes *nifA* est un activateur positif de la transcription des opérons *nif*, Le produit des gènes *nifL* intervient dans le contrôle négatif. On a déjà indiqué que les deux sous- unités de la nitrogénase sont assemblable à partir des gènes *nifH*, *nifD* et *nifK* (Dommergues et al, 1998).

Les gènes *nif* sont spécifiquement impliqués dans le processus de fixation de N_2 et ayant une homologie avec bactéries fixatrices d'azotes libre comme *Klebsiella pneumoniae*, bactérie qui a été utilisée comme modèle pour décrire les gènes *nif* (Pelmout, 1993).

II.9.2. Les gènes *fix*

Les gènes *fix* propre à *Rhizobium* sont aussi spécifiquement impliqués dans la fixation de N_2 (Dommergues et al, 1998), gènes nécessaires aux étapes plus tardives de la contraction d'une nodosité capable de fixer l'azote (Sebihi, 2008), Les fonctions des gènes *fix* sont moins bien connues. Les gènes *fix* A, B, C, X coderaient pour des protéines impliquées dans le transport des électrons vers la nitrogénase. Les gènes *fix* G, H, I, S interviendraient dans les processus d'oxydoréduction au sein du complexe membranaire. Les fonctions des gènes *fix* K, N, R ne

sont pas connues (Dommergues et *al*, 1998), Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses (Dénarié, 2000). Ce transfert latéral des gènes des nodulations a contribué à l'évolution et à l'étendue de la capacité symbiotique (Moulin et *al*, 2004).

Les gènes *fix* n'ont pas d'homologues chez les fixateurs libres, à la différence des gènes *nif* de la fixation d'azote, qui ont de tels homologues (Selosse, 2006).

Chapitre II:

Matériel et méthodes

I-Isolement et identification des souches de *rhizobium* nodulant *Trigonella L.*

I.1. Zones de prélèvements

Les échantillons de sols sont prélevés dans la zone agricole Hammamet Tébessa est située Nord Est Algérien.

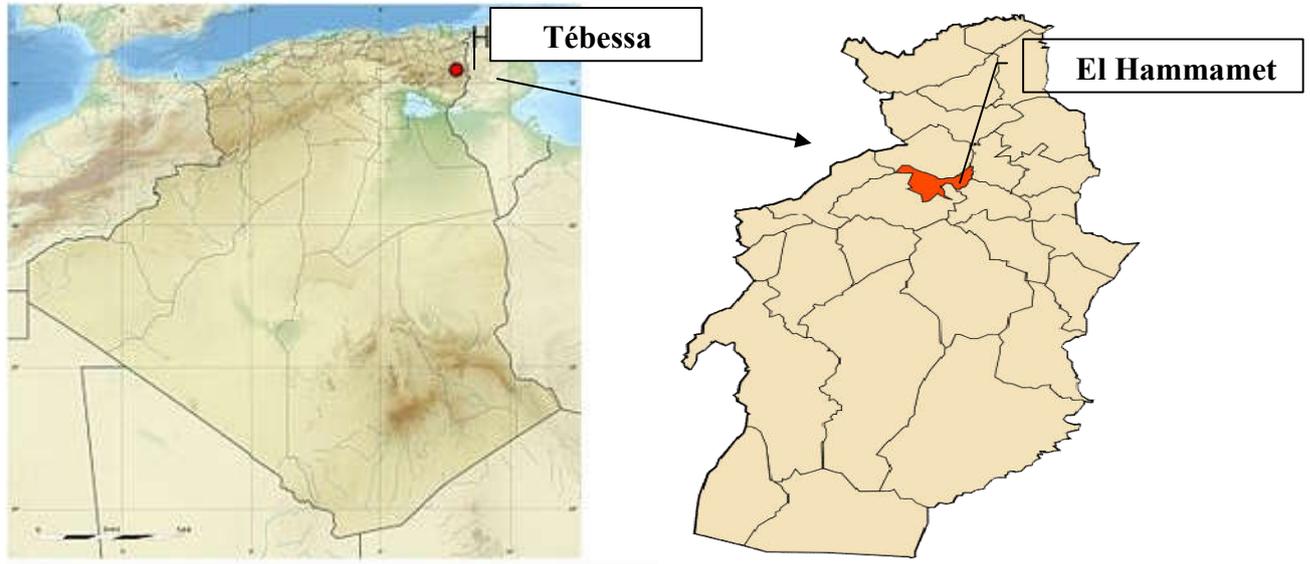


Figure 06 : La carte de la localisation géographique d El Hammamet -Tébessa-(Web5).



Figure 07 : Photo du site de prélèvements des sols El Hammamet Tébessa.

I.2. Matériel végétal

I.2.1. Historique du *Trigonella foenum-grecum L.*

Les plantes de genre *Trigonella* et en particulier de l'espèce cultivée *T. foenum-grecum L.* (fenugrec) sont connus et utilisés à des fins différentes dans les temps anciens en Grec et de l'Egypte (Rock et Mangesha, 1963). Hippocrate en faisait grand cas. Cette plantes a été introduite en Europe centrale au début du 9^e siècle (Mulot, 2005).

Au dix- septième siècle, les graines de fenugrec ont été recommandées pour aider à expulser le placenta de la femme après l'accouchement (Howard, 1987). L'herbe a été longtemps un favori des arabes et il a été étudié à l'école de Salerno par les médecins arabes (Stuart, 1986).

I.2.2. Origine de la plante

Sinskaya (1961) rapporte que les ancêtres sauvages direct du fenugrec cultivés appartiennent à l'espèce *Trigonella foenum-grecum L.* n'a pas été précisé, et l'existence de ces formes sauvages (qui n'ont pas échappé à la culture) est problématique. De nombreux auteurs suggèrent que l'ancêtre direct de l'espèce cultivée est le fenugrec sauvage *T. gladiata* qui diffère de *T. foenum-grecum L.* par l'ensemble de l'agrégat de caractères les plus marquants: dont la tuberculination des semences et la petite taille des gousses. Il est possible que l'espèce *T. foenum-grecum L.* évoluée de *T. gladiata*.

I.2.3. Généralité sur Fenugrec (*Trigonella foenum-grecum L.*)

Fenugrec (séné grain) est une plante herbacée annuelle (Mulot, 2005) ou des vivaces de la famille Fabacées (Bernie et al, 2006), de 30 à 40 cm de hauteur (Girre, 2001). Apparenté au trèfle, ce genre réunit environ quatre- vingt espèces (Bernie et al, 2006).

*Synonymes. Foin grec, séné grain, trigonelle.

*Famille. Légumineuses ou papilionacées.

Cette plante est cultivée. Elle est herbacée. On la trouve en Europe méridionale, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient. Elles mesurent de 30 à 40 cm de haut. Procède des feuilles ovales, dentelées à folioles bleues avec fleurs jaunes, la floraison intervient en mai - juin et fruits sous formes des gousses qui contiennent une quinzaine de graines renferment du phosphore, du fer, du calcium, du magnés, une huile essentielle (lécithine, trigonelline,...) (Mulot, 2005).



Figure 08 : les graines de la plante Fenugrec.

II. Piégeage des *Rhizobiums*

II.1. Germination aseptique des graines

Les graines de *Trigonella* désinfectée à l'éthanol (7/1) pendant 5 minute et immergées dans l'eau javel (9/1) puis elles ont subi une scarification avec l'acide sulfurique pendant 3 minutes, puis ensuite rincées abondamment à l'eau distillée stérile 10 fois et déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélose (0,8 %) stérile et placer à l'obscurité dans une température ambiante. A près germination, les graines germées obtenues sont transférées dans des pots en plastique contenant les échantillons de sols.



Figure 9 : Germination aseptique des graines de *Trigonella*.

Au bout de quatre semaines de culture sous serre dans les pots contenant du sol de la zone de prélèvement, des nodules sont prélevés au niveau des racines (Ghanini, 2014).

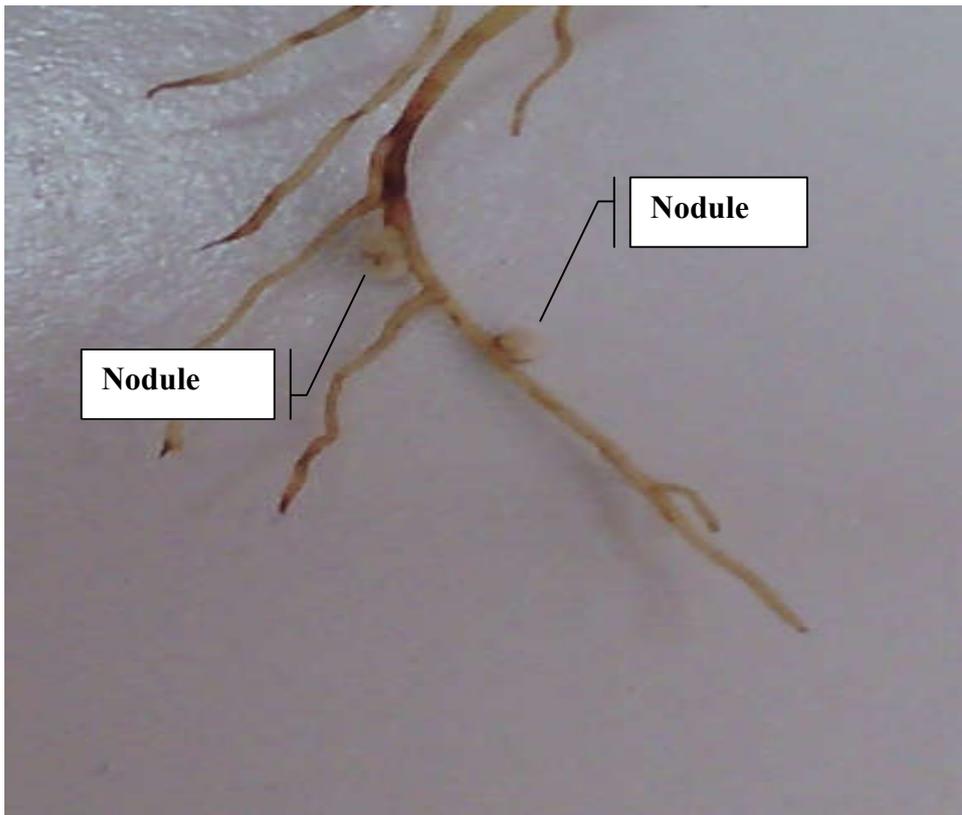


Figure 10 : Piégeage des Rhizobiums par les plants de Trigonella cultivés.

II.2. Isolement des Rhizobiums

II.2.1 Stérilisation des nodules

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol 95% puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié à 1% ($0.1\text{gHgCl}_2+0.5\text{mlHCl}+100\text{ml}$) pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

II.2.2. Ecrasement des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, J.M. (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri à l'aide d'une pince stérile, flambée au bec Bunsen. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale.

II.2.3. Isolement de souches de *Rhizobium*

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrans sur gélose coulé en boîte (YMA+RC), puis incubé dans une étuve à 30C° Pendant 48h (Vincent, 1970).

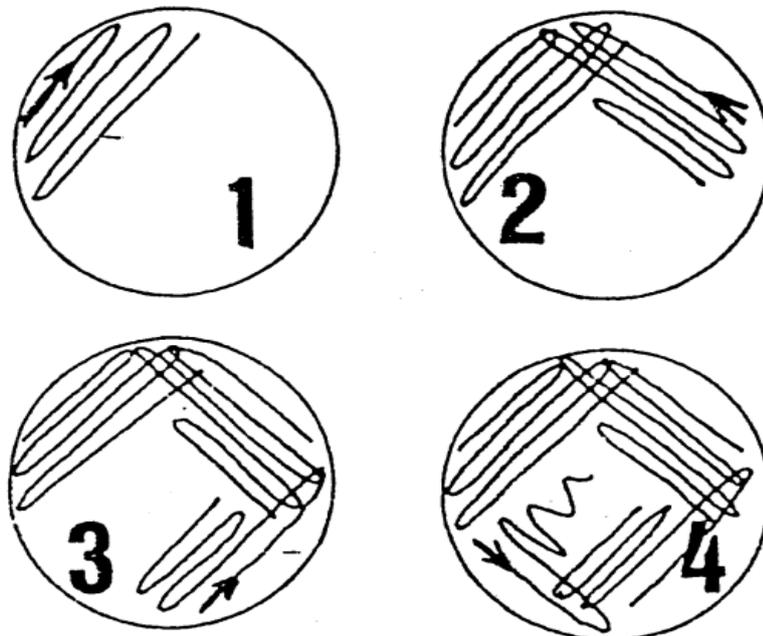


Figure11 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

YMB 1.0 litre

Agar 15 g

PH 6.8

Ajouter l'agar, autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

III.2. Purification des rhizobiums et Conservation des isolats

Les colonies présentant un aspect visqueux et translucides, blanchâtres ont été repiquées plusieurs fois dans des conditions stériles, afin d'être purifiées puis conserver pour faire l'objet de notre étude (Tableau 4).

Tableau 04: les souches et les isolats utilisés dans cette étude

Codes	Souches	Plante hôte	Origine géographique	Source
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. Nov RHA6	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine Algérie	A. Bengueouar Constantine
HS1	<i>Pseudomonas</i> sp.NZ096	<i>Hedysarum capitatum</i>	Constantine Algérie	Y. Benhizia Constantine
HnA	<i>Panotoea</i> <i>agglomerans</i>	<i>Hedysarum naudinianum</i>	Sétif Algérie	A. Troche Constantine
Hca1	<i>Pseudomonas</i> sp.KD	<i>Hedysarum carnosom</i>	Constantine Algérie	Y. Benhizia Constantine
HP7	<i>Enterobacter kob</i>	<i>Hedysarum pallidum</i>	Sétif Algérie	A. Troche Constantine
T1	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T2	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T3	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T4	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T5	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T6	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T7	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T8	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T9	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude
T10	Isolat	<i>Trigonella foenum-grecum</i> L.	El Hammamet Tébessa	Notre étude

IV. Test physiologique

IV.1. Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance (Boudanga, 2011), les souches sont mises en culture sur le milieu YMA solide dans boîte de Pétri et incubées à différentes températures : 4°C, 30°C, 37°C et 44°C à l'étuve pendant 48h à 72h.

IV.2. Effet de la salinité

Le milieu utilisé pour réaliser ce test est le milieu YMB contenant des concentrations en NaCl (1%, 3%, 5%, 7%, 10%) le Ph du milieu de culture est 6,8. Les taux de croissances sont enregistrés en mesurant la densité optique des cultures bactériennes à 600 nm après incubation à 30°C dans un bain-marie agitateur pendant 24h.

IV.3. Effet de Ph

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB liquide à différents pH (2, 4, 6, 8, 10). La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 600 nm après 24 heures d'incubation.

V. Tests biochimiques

V.1. La source de carbone

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB où le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D- Ribose, D-Lactose, D- Fructose, D- Glucose, D- Galactose, D-Xylose, D- Saccharose, à concentration de 0,1%, les tubes sont ensemencés et incubés au bain-marie agitateur à 30°C pendant 24 heures. L'estimation de la croissance est réalisée en mesurant la densité optique à 600 nm (Jordan, 1984).

V.2. La source d'azote

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu YMB additionné chaque fois à l'un des acides aminés : Leucine, Alanine, proline, Glycine, Cystéine, Méthionine. Les tubes sont ensemencés puis incubés à 30°C. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm (Sebihi, 2008).

VI Analyses statistiques :

L'exploitation des données obtenues a été réalisée par l'utilisation des logiciels MINITAB 16, commençant par une ANOVA à deux facteurs sans répétitions des observations par échantillons, ainsi que pour la classification hiérarchique ascendante (CAH). Par contre la matrice de corrélation de PERSON a été réalisée en utilisant le logiciel Excel stat (2014).

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Caractérisation culturaux

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines des *Fenugrec* (*Trigonella foenum-grecum L.*) nous avons pu isoler dix isolats dont les colonies absorbent très peu le Rouge Congo.

I. 1. Croissance sur YMA. RC

La croissance sur YMA. RC des souches isolées à partir des nodules de *Trigonella* absorbé peu le Rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre sur le milieu YMA-RC, les mêmes aspects sont observés avec les souches de références (Figure 12).

Cette propriété est commune avec le genre *Bradyrhizobium*, par contre le genre *Agrobacterium* et les formes des contaminants absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984). Nos résultats sont en accord avec ceux de (Benahmed, 2009) qui mentionne que pour la souche de référence A6 à une faible absorption du RC. Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le RC (Vincent, 1970, Joran, 1984, Sebihi, 2008).



Figure 12: Aspect morphologique d'isolat sur milieu YMA.RC.

I.2. Croissance sur YMA

La croissance sur YMA est détectable après 24 heures d'incubation, les colonies obtenues présentent quatre aspects macroscopique de couleur blanchâtre, translucides, visqueuse, circulaires (Figure 13).

La première classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* s'était basée sur ce critère (Jordan, 1982, 1984). En fait, les souches à croissance rapide (du genre *Rhizobium* possèdent un taux de régénération inférieur à six heures) (Perry et al, 2004, Somasegran et Hoben, 1994) et forment des colonies circulaires convexes généralement translucides avec 4 à 5 jours sous des conditions optimales d'incubation, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* possèdent un taux de régénération de 6 à 8 heures et forment aussi des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation. Des souches qui présentent un temps de régénération intermédiaire ont été rapportées par Jarvis et al (1997). Ces souches ont été assignées à un nouveau genre *Mesrhizobium*.



Figure 13: croissance des isolats et des souches des références sur le milieu YMA.

II. Caractérisation biochimique

II.1. Utilisation des sources de carbone

Les résultats obtenus montrent que les souches utilisent des sources de carbone testées mais avec une différence entre l'une et l'autre. La représentation graphique des mesures de la densité optique (Figure 14), nous indique clairement la différence de l'assimilation des sucres par les isolats.

Les souches Tr5 et Tr6 présentent une bonne croissance en présence du ribose comme source de carbone, on note aussi les meilleures croissances pour la souche Tr1 et Tr4 en présence de galactose, lactose. Le reste des isolats et les souches de références utilisent l'ensemble de la gamme des saccharides.

L'utilisation des sucres peut fournir les caractères différentiels pour l'identification des espèces (Allen et Allen, 1950). Selon Graham (1964), les bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*) présentent un spectre d'assimilation très large vis-à-vis des substrats carbonés par rapport aux bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*).

Les *Rhizobium* ont une aptitude à assimiler les mono- saccharide comme le fructose, glucose, galactose, fructose et xylose; les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyols, par contre Les *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les tri saccharides.

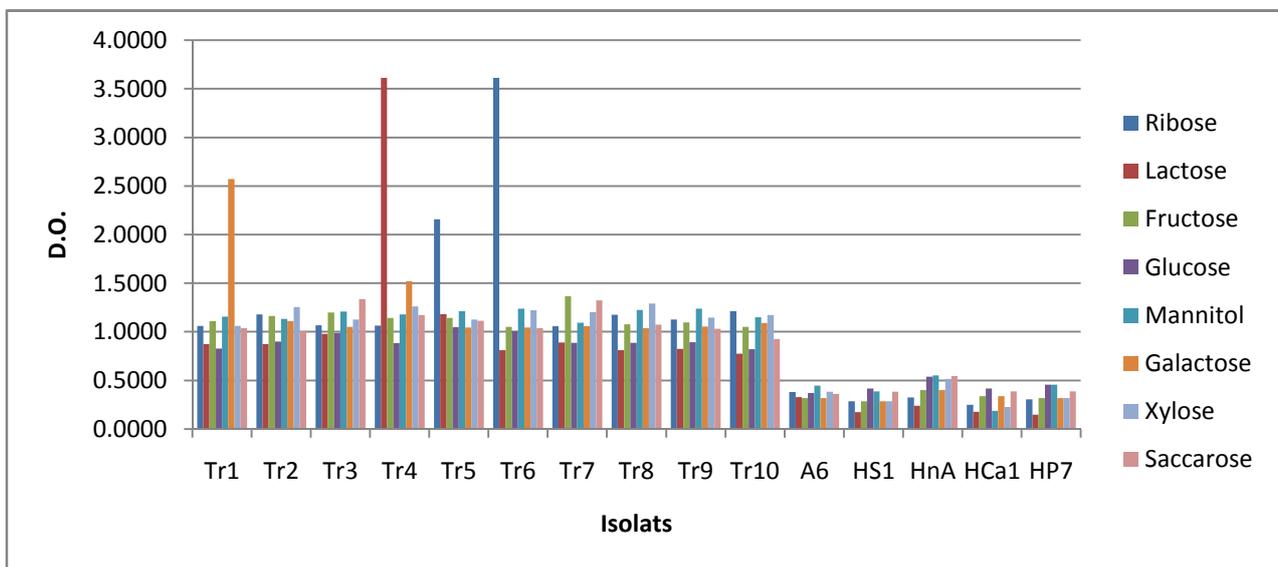


Figure 14 : Utilisation des sources de carbone par les isolats et les souches de références.

Afin de mieux exploiter les résultats obtenus (Annexe 01) une analyse statistique des densités optiques enregistrées par les isolats et les souches de référence étudiés, montre une différence très hautement significatives entre les sucres utilisés, ainsi qu'une différence significative dans l'utilisation de ces derniers par les isolats et les souches de références (Tableau 5). Cette différence d'utilisation des sources de carbone, est fortement liée à la description de nouveaux genres de rhizobiums qui s'accompagne par la révélation d'une grande diversité des profils d'utilisation de sources de carbone (Zhang *et al*, 1991 ; de Lajudie *et al*, 1994).

II.2. Utilisation des sources d'azote

La croissance des souches sur le milieu culture est variable selon la source d'azote et l'acide aminé additionnée. Les souches peuvent pousser en présence de la plupart des acides aminés comme source d'azote.

L'histogramme des mesures de la densité optique (Figure 15), nous indique clairement la différence de l'assimilation des acides aminés par les isolats; l'alanine présente une bonne source d'azote pour la souche Tr2, cystéine pour Tr4 et la proline pour Tr10. Par contre les souches de références montre les plus faibles taux d'assimilation des acides aminés

Ces résultats rejoignent ceux de (Saoudi, 2008) qui ont décrit que les *Rhizobium* assimilent beaucoup mieux l'histidine, l'alanine, la glutamine, la cystéine et la proline que le reste des aminoacides.

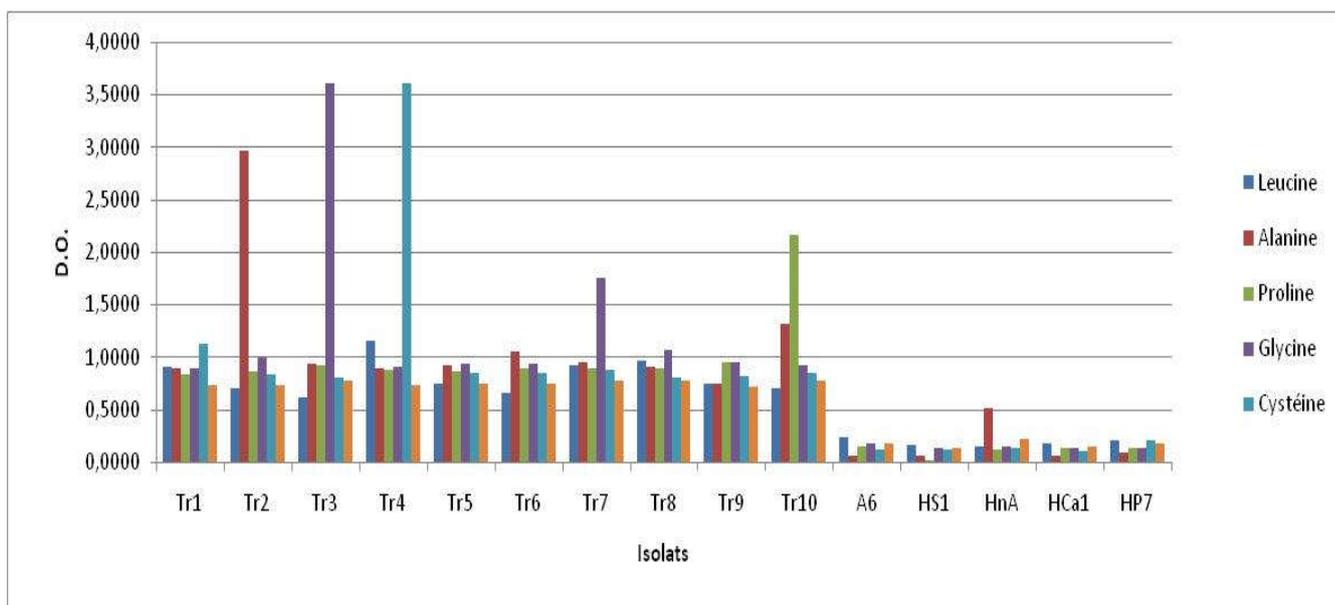


Figure 15 : Utilisation de la source d'azote par les isolats et les souches de références.

L'analyse statistique (Tableau 05) indique une différence très hautement significative entre les acides aminés utilisés, ainsi qu'une différence non significative dans l'utilisation de ces derniers par les isolats et les souches de références. Ce qui va dans le sens des résultats de Nour et al (1994) qui indiquent que les acides aminés ne peuvent pas être utilisés comme source d'azote et qu'ils peuvent jouer un rôle d'inhibiteurs pour la croissance rhizobienne (Jordan, 1984, Dekak, 2010).

III. Caractérisation physiologique

Généralement, les souches de *Rhizobium* possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les milieux arides et semi aride. Le principal facteur limitant de l'activité biologique sont: les températures élevées, les pH extrêmes et la salinité élevée (Caciari et al, 1998).

III.1. Effet de pH

Il ressort de l'histogramme (Figure 16), que l'ensemble des isolats et les souches de références testées sont capables de pousser entre pH2 et pH10. Donc les souches testées dans cette étude présentent un spectre large de tolérance au pH, puisqu'elles sont capables de croître aussi bien à des pH acides qu'alcalins. Selon Graham, (1992) les *rhizobia* à croissance rapide semblent plus sensibles à l'acidité que ne le sont les *rhizobia* à croissance lente.

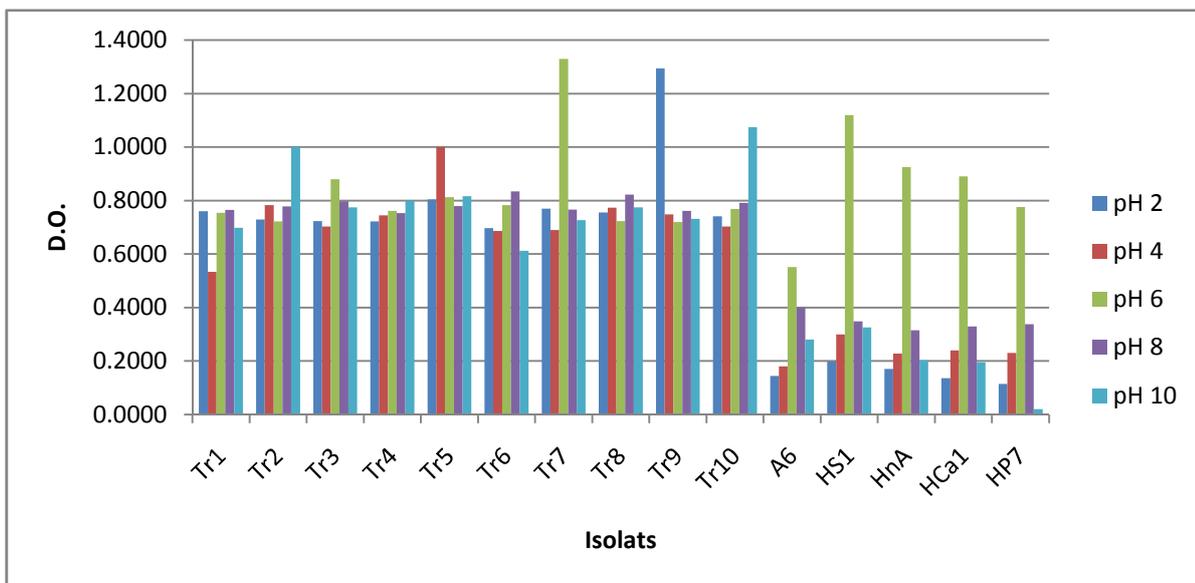


Figure 16 : Effet des différents pH sur la croissance des isolats et les souches de références.

L'analyse statistique des données (annexe 02) fait montrer une différence très hautement significative entre les ph utilisés, et une différence non significative entre les isolats Les résultats enregistrés (Tableau 05) sont en concordance avec celles avancés par Maatallah et al., (2002), qui ont aperçu la croissance de leur isolats a des valeurs de pH comprises entre pH4 et pH supérieur à 7.5.

III.2. Effet de salinité

L'histogramme obtenu, rapportés dans la (Figure17) montre que jusqu'à une salinité de 10% de NaCl, la croissance des souches de référence et de nos isolats n'est pas affectée à l'instar des deux isolats Tr3 et Tr4 ainsi que les souches de références HS1, HnA , HCa1 et HP7 qui ont montré une nette sensibilité a cette même concentration de NaCl. La majorité des isolats et souches de référence demeure osmo-tolérants, bien que la croissance de la totalité des micro-symbiontes étudiés est altérée à 7% de NaCl. D'autre part la symbiose *Rhizobium*-légumineuse et la formation des nodules sur les racines des plantes hôtes sont plus sensibles au stress osmotique que leur *rhizobia*. La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodules ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Zahran, 1999 ; Saadallah *et al.*, 2001).

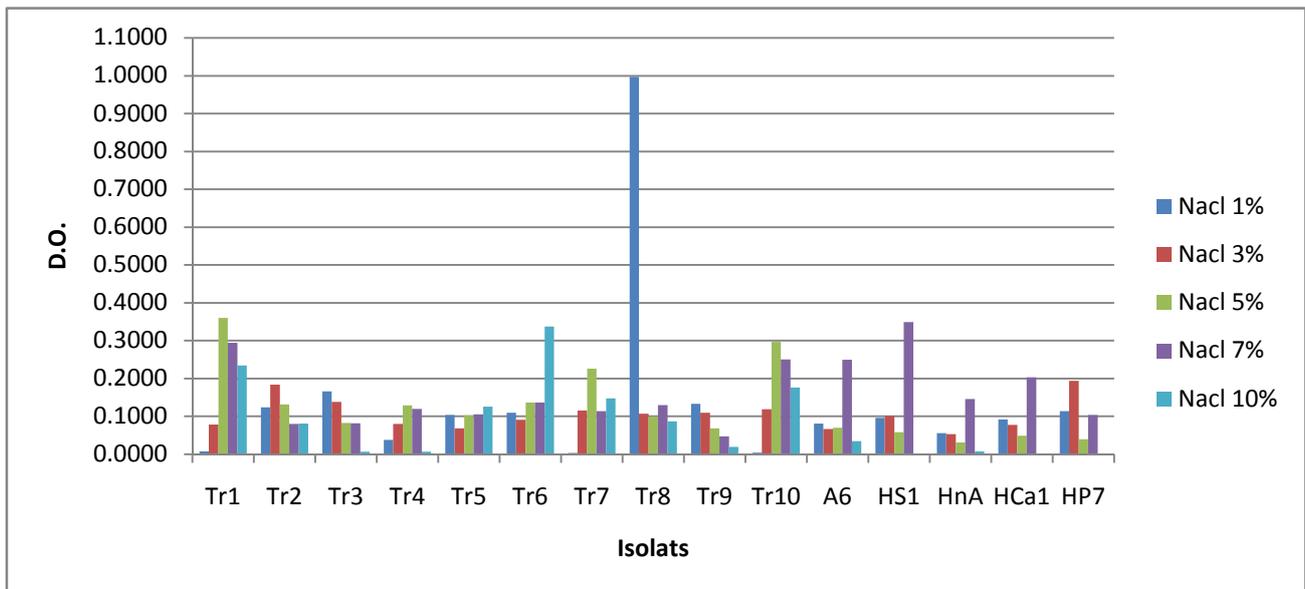


Figure 17 : Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des isolats et les souches de références : Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des isolats et les souches de références

L'étude statistique des résultats (Annexe 02) fait ressortir une différence non significative entre les degrés de pH utilisés, ainsi que pour les différences de croissance des isolats et les souches de références dans ces mêmes degrés de salinités (Tableau 05). Qui peut être expliqué par les travaux de Merabet *et al.*, (2006) qui ont mis en évidence *in vitro* une tolérance à une salinité allant jusqu'à 5% de NaCl, chez des *Rhizobia* isolés de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* dans la sebkha de Misserghine (Oran).

Tableau 05: ANOVA à deux facteurs contrôlés.

Paramètres	Sources de variations	Ddl	SC (Somme de carrés)	CM	F	P
Sources de carbone	Sucres	7	17,7778	2,5399	17,94	0,000***
	Isolats	14	4,0649	0,29035	2,05	0,021*
	Erreur	98	13,8715	0,14155		
	Total	119	35,7141			
Sources d'azote	Acides aminés	5	16,2896	3,25792	14,14	0,000***
	Isolats	14	4,4404	0,31717	1,38	0,188 NS
	Erreur	70	16,1295	0,23042		
	Total	89	36,8596			
pH	pH	4	2,52707	0,631768	14,66	0,000***
	Isolats	14	0,95043	0,067888	1,58	0,115 NS
	Erreur	56	2,41264	0,043083		
	Total	74	5,89014			
NaCl	NaCl	4	0,05637	0,0140917	0,76	0,553 NS
	Isolats	14	0,19264	0,0137601	0,75	0,719 NS
	Erreur	56	1,03167	0,0184226		
	Total	74	1,28067			

[(*) $P < \alpha = 0,05$], [(**) $P < \alpha = 0,01$], [(***) $P < \alpha = 0,001$], [NS : Différence non significatif]

III.3. Effet de température

Les résultats obtenus (Tableau 06), montrent que toutes les souches testées sont capable de croître entre 4°C et 44°C à l'exception des souches HnA, HCa1, HS1 qui n'ont pas pu se développer à la température 44°C et les cinq isolats Tr1, Tr 3, Tr 4, Tr 7 et Tr 10 qui n'ont pas poussés à la température 4°C. Ces résultats corroborent la grande variabilité de la thermotolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de *rhizobia*. Pour la plupart des Rhizobiums, l'intervalle de température de croissance est situé entre 28°C et 31°C et beaucoup d'entre elles sont capable de croître à 37°C (Zahran, 1999). Selon Lindstrom et Lehtomaki (1988), la température maximale de croissance serait de 35°C pour *Rhizobium leguminosarum*, 36°C pour *Sinorhizobium fridii*, 37°C pour *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium galegae*, 41°C pour *Sinorhizobium meliloti* et de 40°C pour *sinorhizobium medicae*

Tableau 06: Effet température sur les isolats.

T⁰ Souche	4⁰C	30⁰C	37⁰C	44⁰C
Tr 1	-	+	+	+
Tr 2	+	+	+	+
Tr 3	-	+	+	+
Tr 4	-	+	+	+
Tr 5	+	+	+	+
Tr 6	+	+	+	+
Tr 7	-	+	+	+
Tr 8	+	+	+	+
Tr 9	+	+	+	+
Tr 10	-	+	+	+
A 6	+ (6j)	+	+	+
HP7	+ (6j)	+	+	+
HS1	+	+	+	-
HnA	+	+	+	-
Hcal	+ (6j)	+	+	-

VI- Biodiversité des isolats :

Le coefficient de PEARSON représenté sous forme d'une matrice des corrélations est élaboré à la base des données enregistrées pour les paramètres étudiés effet du pH, effet de salinité, sources de carbone et sources d'azotes (Tableau 07).

Ce coefficient nous permet d'évaluer et d'estimer le pourcentage de similarité entre les isolats. L'interprétation de cette analyse montre que les isolats (Tr1) à (Tr10) ont des similarités différentes avec l'ensemble des isolats qui est respectivement Tr9=71,1%***, Tr10=65,9%***, Tr7=83,7%***, Tr5=48%*, Tr6=90%***, Tr9= 62,8%** , Tr9=82,6%***, Tr9=83,1%*** et Tr10=73,9%***.

D'autre part les isolats Tr1, Tr2, Tr5, Tr6, Tr7, Tr8 et Tr9 ont affiché des taux de similarité avec les souches de références qui sont mentionnés respectivement A6=44,4%*, HnA=51,7%*, A6=58,9%** , A6=45,6%*, HnA= 61,9%** , A6=50,4%*, A6=54,2% **.

Tableau 07: Matrice des corrélations (coefficient de PEARSON) entre les isolats et les souches de références.

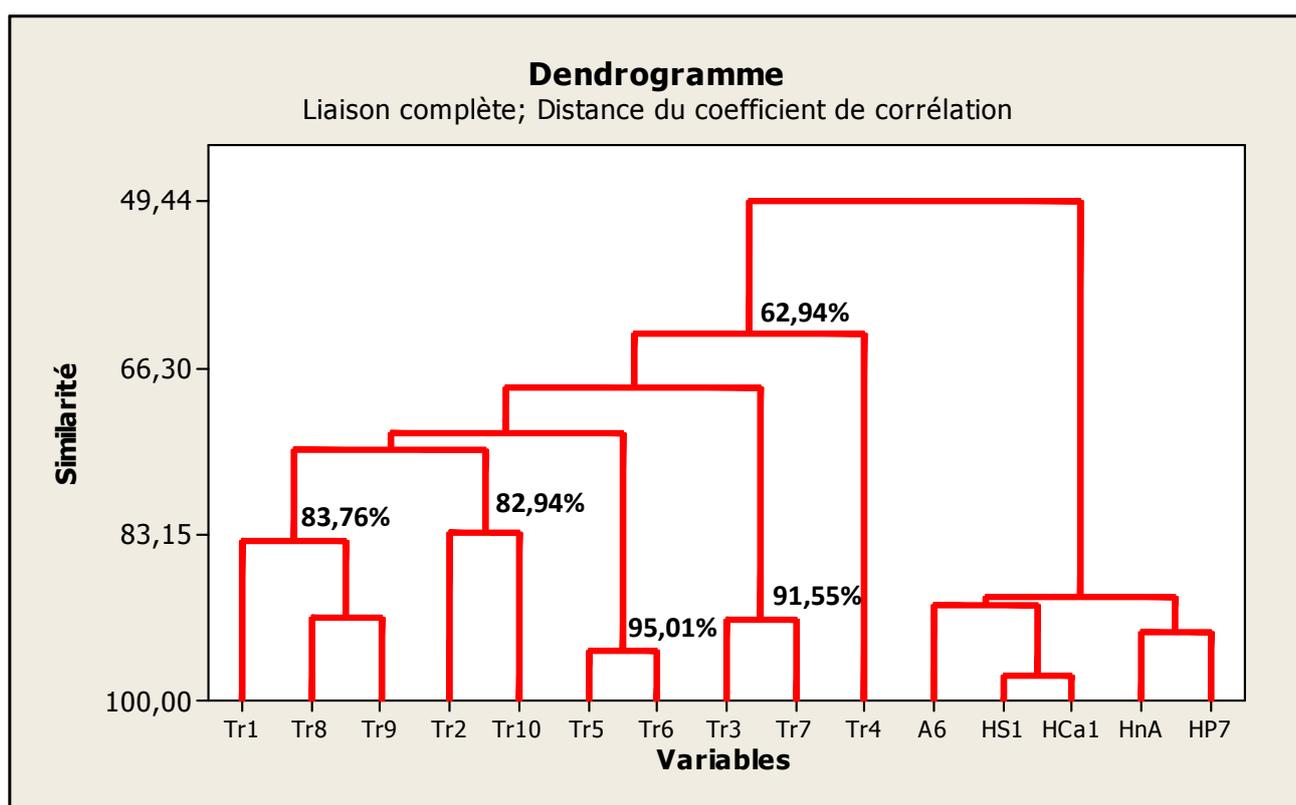
Isolats	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6	Tr7	Tr8	Tr9	Tr10	A6	HS1	HnA	HCa1	HP7
Tr1		0,494	0,425	0,493	0,616	0,460	0,629	0,675	0,711	0,555	0,444	0,174	0,435	0,299	0,362
Tr2	0,014		0,419	0,297	0,598	0,470	0,589	0,590	0,588	0,659	0,179	0,033	0,517	0,079	0,144
Tr3	0,039	0,042		0,268	0,518	0,365	0,837	0,598	0,596	0,452	0,282	0,095	0,269	0,161	0,204
Tr4	0,014	0,159	0,206		0,480	0,259	0,418	0,386	0,462	0,325	0,224	-0,011	0,138	0,048	0,124
Tr5	0,001	0,002	0,009	0,018		0,900	0,739	0,770	0,846	0,674	0,589	0,253	0,507	0,323	0,425
Tr6	0,024	0,020	0,079	0,222	< 0,0001		0,529	0,599	0,628	0,540	0,456	0,157	0,363	0,205	0,327
Tr7	0,001	0,002	< 0,0001	0,042	< 0,0001	0,008		0,746	0,826	0,651	0,573	0,378	0,619	0,476	0,523
Tr8	0,000	0,002	0,002	0,062	< 0,0001	0,002	< 0,0001		0,831	0,628	0,504	0,179	0,493	0,263	0,408
Tr9	< 0,0001	0,003	0,002	0,023	< 0,0001	0,001	< 0,0001	< 0,0001		0,739	0,542	0,237	0,518	0,309	0,422
Tr10	0,005	0,000	0,027	0,121	0,000	0,006	0,001	0,001	< 0,0001		0,308	0,041	0,369	0,150	0,210
A6	0,030	0,402	0,182	0,292	0,002	0,025	0,003	0,012	0,006	0,143		0,810	0,789	0,807	0,822
HS1	0,416	0,877	0,659	0,959	0,234	0,464	0,068	0,404	0,266	0,850	< 0,0001		0,806	0,948	0,853
HnA	0,034	0,010	0,204	0,520	0,012	0,081	0,001	0,014	0,010	0,076	< 0,0001	< 0,0001		0,817	0,862
HCa1	0,156	0,715	0,453	0,823	0,124	0,338	0,019	0,215	0,142	0,483	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		0,886
HP7	0,082	0,502	0,338	0,564	0,039	0,118	0,009	0,048	0,040	0,325	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

Coefficient de PEARSON en haut de la diagonale, Probabilité en dessous de la diagonale. La couleur de (Pr, P) indique le seuil de signification (valeur en bleu : (*) $P < \alpha = 0,05$, vert : (**) $P < \alpha = 0,01$, rouge : (***) $P < \alpha = 0,001$, Noir : Non significatif)

Pour mieux explorer les résultats, et de mettre la lumière sur la biodiversité des isolats qui peuvent être en symbiose avec la *Trigonella* et leurs rapprochements taxonomique des *Rhizobium*. Une classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références a été menée (Figure 18). A partir de la quelle en peut avancer que les isolats regroupés dans un seul cluster lié au cluster des souches de références avec un taux de similarité égale à 49,44%.

Par ailleurs il existe également une biodiversité au sein des micro-symbiotes de la plante hôte *Trigonella*. Formant ainsi cinq sous cluster (SCI : Tr1, Tr8, Tr9), (SCII : Tr2, Tr10), (SCIII : Tr5, Tr6), (SCIV : Tr3, Tr7) et SCV : Tr4 avec des taux de similarités respectivement (Annexe 02) : 83,76%, 82,94%, 95,01%, 91,55% et 62,94%.

Ces résultats sont en accord avec ceux avancés dans la littérature quand a la grande biodiversité phénotypique des micros symbiotes associés aux légumineuses spontanées dans le bassin méditerranéen (Merabet et *al.* 2006 ; Villegas et *al.*2006)



Conclusion générale

Conclusion générale

Notre étude est une contribution à la recherche des caractéristiques des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse médicinale *Trigonella foenum grecum L.*, après piégeage à partir d'un sol agricole localisé au niveau d'El hammamet - Tebessa

Cette caractérisation a pour but l'étude de la biodiversité des isolats, par une approche phénotypique, physiologique et biochimique en présence des souches de référence dont leur position taxonomique est connue. *Rhizobium sllae* (Benguedouar, 2000) et des souches appartenant à la classe des *Gammaprotéobactéria* isolées et caractérisées par Benhizia et al. (2004).

Les dix isolats absorbent peu le Rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre sur le milieu YMA-RC, ayant une vitesse de croissance rapide avec des aspects macroscopique différentes couleur blanchâtre, translucides, visqueuse et circulaires sur le milieu de culture YMA. Ces aspects qui rapprochent nos isolats à des caractéristiques des *Rhizobia*.

L'identification phénotypique repose sur une série de tests, biochimiques et physiologiques. Les isolats ont présenté une variabilité dans l'utilisation des substrats carbonés, les isolats Tr6, Tr5 et Tr1 ont une préférence pour les monosaccharides à l'opposé de l'isolat Tr4 qui a enregistré la meilleure croissance en présence des disaccharides. Par contre le reste des isolats en montrés une bonne croissance en utilisant la totalité de la gamme des sucres utilisés.

L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches a indiqué que les bactéries du genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono- et les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyalcools. A l'opposé, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985).

Les isolats peuvent pousser en présence de la majorité des acides aminés utilisés, avec une préférence de certains acides aminés par quelques isolats. Par ailleurs les souches de références montrent les plus faible taux de croissance pour la totalité des acides aminés.

L'effet des facteurs intrinsèques montre que les isolats sont halotolérants et peuvent résister à une concentration élevée du NaCl arrivant jusqu'à 10%, probablement par le développement des mécanismes de régulation osmotique par les micro-symbiontes. Il apparaît

aussi qu'ils peuvent croître en présence des températures élevées atteignant les 44°C qui leurs confèrent les propriétés des bactéries thermo - tolérantes, on peut signaler la sensibilité aux températures faibles 4°C qui été affiché par les isolats Tr1, Tr3, Tr4, Tr7, Tr10. Les résultats de l'effet du pH révèlent la croissance des isolats à des valeurs comprises entre pH2 et pH10.

L'analyse statistique fait ressortir que les isolats montrent une biodiversité remarquable qui nous permet d'avancer que notre plante hôte *Foenum grecum Trigonella L.* peut être noduler par plusieurs souches de *Rhizobia* présentent au niveau de la rhizosphère.

La classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références, révèle le rapprochement des critères cultureux et morphologiques de nos isolats au celles affichés par les souches de références, et pour cerner d'avantage la position taxonomique des isolats il est judicieux d'approfondir cette investigation en améliorant plusieurs points :

- La détermination du statut taxonomique des isolats de cette étude par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S. L'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les *rhizobia* ou parmi un tout autre genre des Protéobactéries.
- La recherche des possibilités de transe genèse latérale des gènes entre les *rhizobia* et les bactéries de la rhizosphère des légumineuses.
- L'élucidation de la capacité des souches à synthétiser des phytohormones de croissance PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria), ainsi leurs natures chimiques en utilisant des techniques de chromatographie appropriées.
- Elargir le champ de comparaison entre les isolats et les souches de référence en adhérant autres souches de *rhizobia* localisé surtout dans le bassin méditerranéen.

Références bibliographiques

References bibliographiques

A

- **Alami. Y, Champolivier. L, Merrin. A et 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, pp. 524-528.
- **Allen. E. K et Allen. O.N, (1950).** Biochemical and Physiological properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* 14, 173-330.

B

- **Bado. V, (2003).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéennes et soudanienne du Burkina Faso. Thèse pour l'obtention du grade de philosophie Doctorat. Université Laval. Québec.
- **Benabdoun. F, Gheribi. H, Bougusz. D, Franche. C, (2012).** Fixation biologique de l'azote: la symbiose actinorhizienne casuarina- Frankia. Ed: ResearchGate. P 16, 17.
- **Benguedouar. A, (2000).** étude de la symbiose Rhizobium- Hédysarum coronarium: essai de caractérisation de l'espèce Rhizobium "hédysarum". Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie
- **Benhizia. Y, Benhizia. H, Benguedouar. A, Muresu. R, Giacomini. A et Squartini. A, (2006).** Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum*: *H.carnosum* Desf., *Hspinossissimum* subsp. *capitatum* Desf. Et *H.palidum* Desf. Doctorat d'Etat. Université de Constantine. Algérie.
- **Bernie. G, Forrester. S, Greig. D, Guest. S, Harmony. M, Hobley. S (2006).** botanica Encyclopédie de botanique et d'horticulture. Ed : EDV 3p : 239-248.
- **Blandreau. J, (1996).** Fixateur d'azote libres et inoculation bactérienne riziculture in Bougreau M. 2006. Les protéines nodd : élément régulateurs centraux de première étape de la nodulation chez Rhizobia. 1-10.
- **Boudanga. H, (2011).** La biodégradation par culture mixte en réacteur batch. Mémoire de magister en chimie analytique et physique d'université MENTOURI Constantine. 60P.
- **Broughtone. W, J. Jabbouri, S. Perret. X, (2000).** Keys to symbiotic Harmony journal of bacteriology 182 (20) pp 5641- 56525.

- **Bruneton. J, (1993).** Pharmacognosie et photochimie. Plantes médicinales. Paris, France; Lavoisier .278-179.

C

- **Calvet. R, (2003).** Le sol, propriétés et fonctions 1. Ed : DUNOD.P 172, 173, 174.
- **Chabbi. R, (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella L.* (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est Algérien. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister. Constantine.
- **Chalck. G, Subbarao. R, (1998).** Seed inoculation with *Azospirillum* and *Azobacter*. Plant Soil. 53: 295- 302.
- **Claude. M et al, (2011).** Etude des sols description. Ed : DUNOD. P 374.

D

- **Dekak. A, (2010).** Isolement et caractérisation des Bactéries nodulant les Légumineuses endémique des genres *Genista**Argyrolobium*. Thèse de Magister. Université de Tébessa. Algérie.
- **De Lajudie. P, Willems. A, Pot. B et al. (1994).**polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium*and description of *sinorhizobiummeliloti*comb. nov., *Sinorhiaobiumsahelisp.* nov., and *Sinorhizobiumterangasp.* nov. Int. j. Syst. Bacteriol. 44, 715-733.
- **Denaré. J, (2000).** Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8janvier 2000.
- **Dib. C, (2013).** Isolement et caractérisation des *Rhizobium*snodulant de la plante médicinale de genre.Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master .Université de Constantine. Algérie.
- **Dommergues. YE, Duhoux. H, Dien, (1998).** Les arbres fixateurs d'azote, caractéristique fondamental et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropical. Ed : Espayes 34. P 5 à 30.
- **Dreyfus. B, Garcia. J.L et Gillis. M, (1988).** Characterization of *Azorhizobiumcaulinodans*gen. nov sp. a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbaniarostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.

E

- **El- Hilali. I, (2006).** La symbiose *Rhizobium-Lupin*- Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinusluteus*. Thèse de Doctorat de l'université Mohammed V AgdalRabar. Maroc.

- **Emmanuel. L, Paxo. A, De Rafélis. M, (2007).** Géologie. Ed : DUNOD. P 44, 45, 46.

G

- **Ganry. F, Dommergues. Y. R, (1995).** Arbres fixateurs d'azote champ ouvert pour la recherche agriculture et développement édit. 7 : 38-55.
- **Gautier. M, (1993).** La culture fruitière. Ed : TEC TOC. P47.
- **Ghanini. R, (2014).** Agro-physiologique de la réaction de la symbiose fève-Rhizobia sous déficit en phosphore. Mémoire présenté pour l'obtention du master sciences et techniques P ; 20-22.
- **Girre. L, (2006).** Les plantes et les médicaments, l'origine végétale de nos médicaments. Ed : deLachaux et Niestlé. P 124.
- **Craham. P.H, (1964).**The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol.35. 511-517p.

H

- **Hagman. R.V et Burris. R.H, (1978).** Nitrogenase and nitrogenasereductaseassocie and dissociate with achcatalytic cycle. Proc.Natl. Acad. USA, 75, 2699-3005.
- **Hallard. J, (2013).** La technologie de fixation de l'azote par toutes les plantes cultivées n'est pas une bonne solution. Rapport d'ISIS.
- **Hirsch. AM, McKhann. HI, Libler. M, (1992).** Bacterial induced changes in plant form and Action. . J. Plant. SCI. 153.172-181.
- **Hopkins. WG, (2003).** Physiologie végétale. Université des sciences et technologie de Lille. Ed : Boeck.
- **Howard. M, (1987).** Traditional Folk Remedies, A Comprehensive Herbal, Centry Hutchinson Ltd, London.
- **Hynes. MF et O'Connell. MP, (1990).** Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium ligumineusarum*. Can. J. Microbiol. 864-896.

J

- **Jarvis. BW, Pankhurst. CE, Patel. J, (1982).** *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 32,378-380.
- **Jordan. DC, (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan. 1980 *iradvrhizohiumgen*. Nov.agcnus of slow-growing rool nodule bacteria from legumimimious plants. luis. J. Systm. Bacteriol. 32, 136-139.

- **Jordan. DC, (1984).** *Rhizohiaceae*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. P; 234-245.

K

- 1 **KLuykendall. D, Saxen. B, Devine. TE, Udell. SE, (1992).** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) and a proposal for *Bradyrhizobium melkani* sp. Nov. *Can. J. Microbiol.* 501- 505.
 - 2 **Kouakou. RF, (2011).** Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'Angole (Cajanuscajan 1.) à Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire), 122-123p.
- **Kundu. S, (2003) .** Distal heme pocket regulation of ligand binding and stability in soy bean leghemoglobin. *Protéine : structure, Functions and genetics.* 239-248.

L

- **Lamaze. T S, Khamis. C, Foyer. J, Farineau. M. H, Valadier. J. F, Morot-Gaudy, (1990).** Effet d'une limitation en (N) sur la photosynthèse chez le maïs. Ed : INRA. P 113-121.
- **Leclerc. H.J.L, (1995).** *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien.* DOIN EDITEURS. 412-415.
- **Legros. J, (2007).** *Les grands sols du monde.* Ed : PPUR. P 503, 504.
- **Lindstrom. K, Lehtomaki. S, (1988).** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* SP. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. Ed. *FEMS Microbiol. Lett.* 50? 277-287p.
- **Luwig. L, A (1980).** Physiological Roles of Glutamine Synthetase I and II in Ammonium Assimilation in *Rhizobium* sp. *Jornal of bactériologie .* 1209-1216.

M

- **Maâtallah, J., E. B., Berraho, S., Munoz, J., Sanjuan, and C. Lluch.; (2002).** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22, 321-329.
- **Macheix. J. A, Fleuriet. C. J, Allemand, (2005).** les composés phénoliques des végétaux. Ed : PPUR. P : 68-73.
- **Madigan. M, Martink. J, (2007).** *Brock biologie des microorganismes 11^e.* Ed : Person Education France.
- **Maougal. T. H, (2004).** Techniques de production d'inoculation *Rhizobial*. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*): Inoculation et nodulation. En vue de l'obtention du diplôme de magister en biotechnologies végétale. Constantine.

- **Militao. C, (2004).** Etude de cycle d'azote. Botanique. Rev17.
- **Mioulane. P, (2006).** L'âme des plantes. Ed: Rustica. P 244.
- **Moulin. L, Munive. A, Dreyfus. B, Boivin- Masson. C, (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. Nature 411, 948-950.

N

- **Ndoye. I, (1990).** Contribution a l'étude de la symbiose entre *azorhizobium*, *rhizobium* et *sesbania rostra*. Thèse de doctorat d'université des sciences et techniques de Lille. 24P.
- **Newton. W. R, (1998).** Nitrogénase: fonction et évolution. Bull.soc.fr.Microbiol. 13: P 238, 239, 240, 241.
- **Nick. G, de Lajudie. P, Eardly. B.D, Suomalainen. S, Plin. L, Zhang. X, Gillis. M, et Lindstrom. K, (1999).** *sinorhizobiumarboris* sp. Nov. and *Sinorhizobiumkostiense* sp. Nov. isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. Int. J. Syst. Bacteriol.49, 1359-1368.
- **Nour.S. M, Fernandez. M.P, Normand. P, Cleyet-Marel. J.C, (1998).** *Rhizobium ciceris* sp. Nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*cicerarietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol. 44 (3): 511-522p.
- **Nultsch. W, (1998).** Botanique Générale 10^e. Ed: Boeck. P 346, 347, 364, 365, 366, 368, 371, 372, 373, 374, 375, 378.

P

- **Pawlowski, K.; and Bisseling, T.:(1996).** Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell*. 8, 1899-1913.
- **Pelmout. J, (1993).** Bactérie et environnement, adaptation physiologique. Ed : EDPS. P 541, 549.
- **Péret. P, (2007).** Transport d'auxine et développements du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Causuarinaglauca*. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II. France.
- **Perry. J, Stalex. J.T, Lory. S, (2004).** Microbiologie cours et question de revision. Ed : Dunod. Paris. France.
- **Pujic. P, Normand. P, (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. Ed. Biofecture. P 26, 27, 28, 29.

Q

- **Quéguinern, Z.; X, and Lee, S. T.; (2005):***Rhizobium daejeonense* sp. Nov., isolated from a cyanide treatment bioreactor. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 55; 2543-2549.

R

- **Raven. P. H, Evert. P, (2007).** Biologie végétale 3^e. Ed: Boeck. P49, 306, 741.
- **Renier. A, (2008).** Approche pluridisciplinaire de la symbiose *Methylobacterium nodulans* ; *Crotalaria podocarpa*, Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier II –France
- **Roger. P, Dommergues. Y, Balandreau. J, Drefus. B, Sougoufra. B, (1996).** La fixation biologique de l'azote, quelles potentialités pour le développement 2.
- **Rome. S, Fernandez. M.P, Brunel. B, Norman. P, Cleyet-Marel. J.C. (1996).***Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 972-980.

S

- **Saadallah. K, Abdelly. C, Drevon J.J, (2003).** Fixation biologique de l'azote en conditions de salinité et de déficience en phosphore chez deux variétés de haricot: Coco blanc sensible et BAT 477 tolérant. In: Drevon J.J. et Sifi B. (Eds): Fixation symbiotique de L'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. INRA. Paris. Les Colloques, n°100. pp 203-216.
- **Saoudi. M, (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Constantine.
- **Scholla. M.H, et Elkan. G.H, (1984).** *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulate soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 484-486p.
- **Schultze. M, Kondorosi. E, Rater. P, Buiré. M, Kondorosi. A, (1994).** Cell and molecular biology of rhizobium-plant interactions. Int. Rev Cytol. 156: 1-75.
- **Sinskaya. E, (1962).** Flora of cultivated plants of the USSR XIII. Perennial leguminous plants, part I. Medic.
- **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 pour l'obtention de Magister en Génétique et Amélioration des plantes d'Université Mentouri de Constantine. 59-69p.

- **Segovia. L, Young. P.W et Martinez-Romaro. E, (1993).** Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseolitype* I strains as *Rhizobium etlis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 374-377.
- **Selosse. M.A, (2006).** La symbiose structure et fonction, rôle écologique et environnement et évolution. Ed : Vuibert. P 88, 97.
- **Simms. E.L, Taylor. D. I, (2002).** Partner choice in nitrogen- fixation mutualisms of legume and *Rhizobia*. Integ. And Comp. Bio. 369- 380.
- **Soltner. D, (2005).** Les bases de la production végétale 24^e. Ed: CSTA. P 118, 133, 135, 167, 169, 373.
- **Somasegaran. P, Hoben. H.J, (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.
- **Spaink H. P, Arts. A, Stacey. G, Bloemberg.G. V, Lugtenberg. B.J.J et Spaink. H. P, (1992).** Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin layer chromatography . MPMI. 72-80.
- **Stuart. M, (1986).** The encyclopaedia of Herbs and Herbalism, Orbis, London.
- **Svistoonoff. S, (2003).** Implication d'une subtilise dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de Doctorat de l'université Montpellier II. France.

T

- **Tortora. G. I, Funk. B.R, Case. C. L, (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique.
- **Tourte. Y, Bordoncan. M, Henry. M, (2005).** Le monde des végétaux organization, physiologie et génomique. Ed: Dunod. Paris. France.
- **Torche. A, (2006).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Université de Constantine.

V

- **Vale. A, (2006):** *Rhizobium lusitanum* sp. nov., a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 56, 2631-2637.
- **Vilain. M, (1997).** La production végétale: les composantes de la production. Ed : TEC TOC. P221, 222.
- **Vincent. J. M, (1970).** A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP handbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England.

W

- **Wade. T, Krasov. S, (1998).** Etude de la photosynthèse bactérienne chez *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene*. Photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière : 2.

X

- **Xu. L.M, Ge. C, Cui.. Z, Li et Fan. H, (1995).***Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. Isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(4), 706-711.

Y

- **Yann. P, (2006).** Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium- Légumineuse* Master recherche: Microorganisme du génome aux interactions avec l'hôte. Paul Sabatier Toulouse III.

Z

- **Zahran. H.H, (1999).** *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 968-989.
- **Zhang. X.X, Harper. R et Lindstrom. K, (1991).** Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 104-113.

Site Web

- **Site 01:**
http://www.google.dz/search?q=cycle+d'azote&biw=600&bih=976&prmd=ivn&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWjjwcO39_3MAhXEVxQKHAA6BOwQ_AUIBigB.
- **Site 02 :**
<http://www.google.dz/search?ei=iRpKV4HuIYqraj7gcgB&q=mol%C3%A9culaire+entre+les+deux+partenaires+symbiotiques+implique+1%27action+des+facteurs+nod&btnG=>.
- **Site 03 :**
http://www.google.dz/search?q=carte+de+la+localisation+g%C3%A9ographique+d+El+Hammamet&biw=600&bih=976&prmd=imnv&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWjmrLO4-f3MAhUFQBQKHZOJCcEQ_AUIBigB.
- **Site 04 :**
http://www.google.dz/search?q=azote+atmosph%C3%A9rique&prmd=ivn&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWjTptmbkP_MAhWKcBoKHdSQDH8Q_AUIBygB&biw=600&bih=907.
- **Site 05 :**
http://www.google.dz/search?q=carte+Hammamet+tebessa&prmd=ivn&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwigspX4kP_MAhUJOxoKHcTPB8wQ_AUIBygB.

Annexe

Annexe 01 : Tableau des résultats de la mesure des densités optiques des différents tests

Souches	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6	Tr7	Tr8	Tr9	Tr10
NaCl										
1%	0,3600	0,1241	0,1658	0,0381	0,1039	0,1097	0,0032	0,9970	0,1332	0,0042
3%	0,0076	0,1843	0,0830	0,0803	0,0681	0,0908	0,1154	0,1069	0,0192	0,2971
5%	0,0782	0,0802	0,1385	0,1290	0,1033	0,1368	0,2264	0,0994	0,1096	0,1189
7%	0,2946	0,1316	0,0818	0,1195	0,1052	0,1367	0,1140	0,1295	0,0471	0,1763
10%	0,2349	0,0813	0,0071	0,0071	0,1259	0,3372	0,1475	0,0868	0,0681	0,2502
pH										
2	0,7598	0,7297	0,7230	0,7222	0,8044	0,6971	0,7700	0,7550	1,2932	0,7413
4	0,5331	0,7827	0,7025	0,7451	0,9999	0,6868	0,6896	0,7734	0,7478	0,7035
6	0,7538	0,7222	0,8792	0,7610	0,8126	0,7833	1,3290	0,7230	0,7200	0,7684
8	0,7656	0,7776	0,7970	0,7532	0,7788	0,8345	0,7666	0,8228	0,7610	0,7917
10	0,6982	0,9999	0,7740	0,8000	0,8164	0,6123	0,7272	0,7747	0,7318	1,0739
Sucres										
Ribose	1,0596	1,1777	1,0658	1,0626	2,1575	3,6123	1,0585	1,1753	1,1251	1,2126
Lactose	0,8723	0,8723	0,9773	3,6123	1,1833	0,8115	0,8884	0,8109	0,8237	0,7756
Fructose	1,1099	1,1621	1,1998	1,1432	1,1432	1,0507	1,3656	1,0782	1,0964	1,0507
Glucose	0,8273	0,9005	0,9875	0,8832	1,0476	1,0087	0,8872	0,8851	0,8934	0,8213
Mannitol	1,1559	1,1338	1,2101	1,1793	1,2126	1,2367	1,0931	1,2258	1,2394	1,1506
Galactose	2,5709	1,1099	1,0524	1,5210	1,0435	1,0435	1,0566	1,0377	1,0554	1,0898
Xylose	1,0596	1,2534	1,1251	1,2601	1,1251	1,2213	1,2015	1,2900	1,1447	1,1737
Saccharose	1,0394	1,0087	1,3358	1,1737	1,1127	1,0377	1,3245	1,0751	1,0308	0,9257
Acides aminés										
Leucine	0,9091	0,7054	0,6123	1,1506	0,7495	0,6586	0,9221	0,9567	0,7430	0,6948
Alanine	0,8864	2,9591	0,9347	0,8864	0,9265	1,0453	0,9496	0,9103	0,7451	1,3080
Proline	0,8337	0,8568	0,9177	0,8704	0,8549	0,8942	0,8955	0,8962	0,9435	2,1575
Glycine	0,8893	0,9938	3,6123	0,9103	0,9388	0,9402	1,7550	1,0720	0,9458	0,9133
Cystéine	1,1230	0,8309	0,8075	3,6123	0,8436	0,8511	0,8704	0,8041	0,8126	0,8467
Méthionine	0,7372	0,7372	0,7804	0,7358	0,7480	0,7430	0,7703	0,7756	0,7196	0,7788

Annexe 02 : Analyse hiérarchique des variables : Tr1; Tr2; Tr3; Tr4; Tr5; Tr6; Tr7; ...

Distance du coefficient de corrélation, Liaison complète
Etapas de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes liés		Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans le nouveau groupe
1	14	97,4122	0,05176	12	14	12	2
2	13	95,0162	0,09968	5	6	5	2
3	12	93,1055	0,13789	13	15	13	2
4	11	91,8641	0,16272	3	7	3	2
5	10	91,5535	0,16893	8	9	8	2
6	9	90,3270	0,19346	11	12	11	3
7	8	89,4658	0,21068	11	13	11	5
8	7	83,7613	0,32477	1	8	1	3
9	6	82,9441	0,34112	2	10	2	2
10	5	74,6938	0,50612	1	2	1	5
11	4	72,9852	0,54030	1	5	1	7
12	3	68,2665	0,63467	1	3	1	9
13	2	62,9443	0,74111	1	4	1	10
14	1	49,4441	1,01112	1	11	1	15