

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Constantine1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

N° d'ordre :

Série :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie

Spécialité : Ecologie Microbienne

Isolement et caractérisation des bactéries nodulant
la légumineuse *Pisum sativum* L. cultivée dans
différents écosystèmes de l'Est et Centre Algérien

Présenté et soutenu par :

Bellir Darine Nousseiba et Ziada Meriem

Devant le jury d'évaluation :

Président :	Mr Hamidechi Abdelhafid	Professeur	Université Constantine1
Rapporteur :	Mlle Gaci Meriem	Maitre assistante A	Université Constantine1
Examineur :	Mr Chabbi Rabeh	Maitre assistant A	Université Constantine1

Année Universitaire 2013-2014

REMERCIEMENTS

Nos Remerciements sont d'abord au «Dieu », qui nous a donné la force pour terminer ce travail.

Nous tenons à adresser l'expression de nos vifs remerciements à toute personne ayant collaboré de près ou loin à la réalisation de ce travail, particulièrement

Mlle Gaci Meriem, Maitre Assistante à l'université Constantine 1 qui nous a fait l'honneur de bien vouloir assuré la direction de ce mémoire. Nous vous remercions pour votre soutien, la pertinence de vos conseils, votre grande disponibilité et votre patience.

Mr Benguedouar A, Professeur à l'université Constantine 1, pour nous avoir accepté dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne,

Mr Hamidchi, Professeur à l'université Constantine 1, pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire,

Mr chabbi, Maitre Assistant à l'université Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner et juger notre travail,

Mr Khelifi, Professeur à l'université Constantine 1 et membre du laboratoire de Biochimie et Génétique des Plantes qui nous a donné la chance de réaliser un profil des protéines totales SDS-PAGE.

Nos derniers remerciement et ce ne sont pas les moindres, vont aux membres du laboratoire de biotechnologies et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce travail, à mes parents qui m'ont toujours soutenu pendant i tout au long de mes études la flamme qui éclaire ma vie « ma mère » source de tendresse et de sacrifice et mon respectueux père.

Mon mari Djallel,

Ma fille serine

Ma sœur Rayen

Mon frère mehdi

Toute ma famille

Tout mes amies et mes collègues de l'écologie microbienne.

Meriem

Dédicace

Aux deux être qui me sont très chers, ceux qui ont fait que je sois ici aujourd'hui..., Eh oui, mes parents, vous qui m'avez élevé et éduqué...vous qui avez toujours été là pour moi, aucun mot ni aucune langue ne pourrait exprimer ma profonde gratitude à votre égard.

A mon frère Heïthem.

A mes amies Aïcha et Houda.

A mes oncles et mes tantes et leurs filles et fils.

A tous ceux que j'aime et m'aime surtout nounou.

A tous mes amies et collègues.

A tous ceux qui ont veillé à mon instruction.

Avec l'expression de tous mes sentiments et mon respect.

Je dédie ce modeste travail.

Daríne

Abstract

Amongst numerous leguminous plants we have been interested throughout this work in studying the biodiversity of the existant bacterial population, the field pea which has the copacity to nodulate bacterial species.

We made an isolation and purification of 13 strains from the legume roots *Pisum Sativum* L, taken from different Algerian region.

The biochemical tests evaluated the presence of an enzymatic activity among the isolated such as the nitrate reductase, the urease and the cellulose. The nutritional and physiological tests show a diversity among the strains.

In order to determine a protein profile with the use SDS-PAGE technique. Which developed the rapid growth of the strains so as to obtain the profiles comparable to those of *Rhizobium*.

Keywords : *Pisum sativum* L, bacteria that nodulate leguminous plants (BNL), nodules, symbiosis and nodulation test .

Résumé

Parmi de nombreuses légumineuses, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à étudier la biodiversité des bactéries nodulant le pois fourrager. Nous avons effectués un isolement et purification de 13 souches à partir des racines de la légumineuse *Pisum sativum* L., issue de différentes régions algériennes.

Les tests biochimiques ont évalué la présence d'une activité enzymatique chez les isolats tels que la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase. Les tests nutritionnels et physiologiques montrent une diversité entre les souches.

La technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS a révélé un polymorphisme entre les isolats et la souche témoin.

Mots clés : *Pisum sativum* L., Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL), nodules, symbiose, test de nodulation.

ملخص

بين العديد من الباقوليات نحن نهتم في هذا العمل بدراسة التنوع البيولوجي لبكتيريا معزولة من عقد جذرية لنبات البازلاء حيث قمنا بعزل 13 سلالة جمعت من مناطق جزائرية مختلفة. تظهر الاختبارات البيوكيميائية وجود النشاط الانزيمي في السلالات المنعزلة مثل . كما تظهر الاختبارات الفزيولوجية و الغدائية التنوع بين السلالات و الكشف على محتوى البروتينات الكلية عن طريق تقنية الهجرة الكهربائية على هلام . تعدد الأشكال بين السلالات المعزولة و السلالة المرجعية.

الكلمات المفتاحية

Pisum sativum L . التعايش . العقد الجذرية . البكتيريا المشكلة للعقد الباقوليات . اختبار التكوين العقدي.

Liste des figures

Figure 1: Processus microbiens impliqués dans le cycle de l'azote.....	2
Figure 2: Transformation de l'azote dans le sol par nitrification et dénitrification (Wrage et <i>al.</i> ,2001).....	5
Figure3: Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).....	13
Figure 4: Conservation des nodules.....	17
Figure 5: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).....	18
Figure 6: Disposition des nodules sur les racines du pois fourrager.....	31
Figure 7: : Utilisation des différentes vitamines par les isolats et la souche de référence	
A : après 24 heures d'incubation.....	42
B : après 48 heures d'incubation.....	42
Figure 8: Effet de NaCl après 24h d'incubation sur la croissance des souches étudiées....	44
Figure 9: Effet de NaCl après 48h d'incubation sur la croissance des souches étudiées....	44
Figure 10: Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 24h d'incubation.....	46
Figure 11: Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 48h.....	46
Figure 12 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrilamide des protéines totales.....	49
Figure 13: Dendogramme montrant les relations entre nos isolats et la souche de référence.....	52

Liste des photographies

Photographie1: La plante du pois fourragé <i>Pisum sativum</i> L. (Anonyme, 2014).....	8
Photographie 2: La culture des plantes en tubes à essai	20
Photographie3: Dépôt des échantillons dans les puits	25
Photographie 4: Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA + rouge Congo ...	27
Photographie 5: Acidification du milieu YMA+BTB après 24 heures d'incubation ...	28
Photographie 6: Croissance des bactéries sur le milieu GPA+ BCP	29
Photographie 7: Observation microscopique des bactéries (Objectif X100).....	29
Photographie 8: Germination des graines du pois fourrager après 3 jours d'incubation	30
Photographie 9: Croissance des plantes en tubes à essai	30
Photographie10: : Racines nodulées par quelques isolats	32
Photographie 11 : Racines nodulées par la souche de référence <i>R. l. bv. Viciae</i>	32
Photographie 12: Test de l'uréase	35
Photographie 13: Réduction des nitrates	37
Photographie14: Croissance des isolats en présence de quelques sucres	39
Photographie 15: Croissance des isolats en présence de quelques acides aminés	41
Photographie 16 : Croissance des isolats à quelques températures	47

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les derniers remaniements de la classification des BNL selon Weir, BS (2012) dont la dernière mise à jour du 2 Mai 20139
Tableau 2 : Les isolats utilisés dans cette étude26
Tableau 3 : Nombre et caractéristiques des nodules produits sur chaque plante32
Tableau 4 : Activité enzymatique des isolats et de la souche témoin (Hydrolyse de l'urée)...	35
Tableau 5 : Assimilation des substrats carbonés par les isolats et la souche de référence38
Tableau 6 : Utilisation des différents acides aminés par les isolats et souche témoin40
Tableau 7 : Croissance des isolats et la souche témoin à différentes températures48
Tableau 8 : Présence et absence des bandes protéiques50
Tableau 9 : Matrice de similitude des profils protéiques51

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 Etude Bibliographique	
1. Cycle de l'azote	2
1.1 La fixation d'azote.....	3
1.2. Ammonification.....	4
1.3. Nitrification	5
1.4. Dénitrification	6
2 .Symbiose légumineuse / rhizobia.....	6
2.1. Les légumineuses	6
- Les Caesalpinioideae.....	7
- Les Mimosoideae	7
.-Les Papilionoideae	7
2.1.1. <i>Pisum sativum</i> L.	7
2.2. Les Bactéries nodulant les légumineuses (BNL)	8
2.2.1. Taxonomie des BNL	8
2.3. La nodulation	12
122.3.1. Les étapes de la nodulation	12
2.3.1.1. Echange de signal d'infection.....	13
2.3.1.2. Infection	14
2.3.1.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes	14
2.4. Génétique de la fixation	15
2.4.1. Les flavonoïdes.....	15

2.4.2. Le gène <i>nodD</i>	15
2.4.3. Les gènes <i>nif</i>	16

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Isolement des bactéries nodulant le pois fourrager	17
1.1. Les sites d'échantillonnage et origine des graines.....	17
1.2. Conservation des nodules	17
1.3. Isolement des bactéries	18
a) Désinfection des nodules	18
b) Isolement des bactéries	18
c) Purification des isolats	19
d) Conservation des isolats.....	19
2. Test de nodulation	19
2.1. Désinfection et germination des graines	19
2.2. Préparation des tubes.....	20
3. Caractérisation phénotypique des isolats	20
3.1. Tests biochimiques.....	20
3.1.1 Hydrolyse de l'urée	20
3.1.2 Réduction des nitrates	21
3.1.3 Activité cellulolytique.....	21
3.2 Tests nutritionnels	22
3.2.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone	22
3.2.2 Utilisation des sucres comme seule source d'azote	22
3.2.3 Besoin en vitamines.....	22
3.3. Tests physiologiques	22

3.3.1 Tolérance au NaCl.....	22
3.3.2 Effet du pH.....	23
3.3.3 Effet de la température	23
3 :3. SDS-PAGE des protéines.....	23
3.3.1 Principe.....	23
3.3.2 Préparation des extraits protéiques	24
3.3.3 Préparation des plaques de gel	24
3.3.4 Dépôts des échantillons et migration électrophorétique.....	24
3.3.5 Révélation des bandes protéiques	25

Chapitre 3: Résultats et discussion

1. Caractéristiques morphologiques et culturaux des isolats.....	26
1.1 Croissance sur les différents milieux de cultures	26
1.1.1 Le milieu YMA + rouge Congo	26
1.1.2 Bouillon YMB.....	27
1.1.3 Croissance sur le milieu YMA contenant le BTB	27
1.1.4 Le milieu GPA+BCP.....	28
1.2. Examen microscopique	29
2 Test de nodulation	30
3. Caractérisation phénotypiques des isolats.....	34
3.1 Tests biochimiques	34
3.1.1 Hydrolyse de l'urée	34
3.1.2 Réduction des nitrates	36
3.1.3 Activité cellulolytique	37
3.2 Tests nutritionnels	38

3.2.1. Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote	38
3.2.2. Utilisation des sucres comme seule source de carbone	39
3.2.3. Besoins en vitamines	41
3.3 Tests physiologiques (facteurs intrinsèques).....	43
3.3.1 Tolérance au Nacl	43
3.3.2 Effet du pH.....	45
3.3.3 Effet de la température	47
3.4 Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE.....	49
Conclusion	53
Références bibliographiques	55
Annexes	

Introduction

Introduction

La culture des légumineuses fournit depuis les débuts de l'agriculture une source essentielle de protéines pour l'alimentation humaine et animale. Leur capacité à fixer l'azote atmosphérique génère un double intérêt, économique par une moindre utilisation d'engrais azotés de synthèse, et écologique par une limitation des fuites azotées. Cependant le cycle d'azote joue un rôle capital dans l'agriculture. L'azote est un facteur majeur limitant la production agricole. La symbiose des légumineuses et la plante hôte présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais azoté.

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique de l'azote moléculaire du globe, les plus connues sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses. Les rhizobia sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines et parfois sur les tiges des légumineuses la formation des organes particuliers appelés nodules. Une spécifique d'hôte, plus ou moins étroite, fondée sur un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie. Des composés phénoliques émis au niveau des racines de la plante entraînent l'activation de gènes de nodulation bactériens et la synthèse de facteurs de nodulation responsables de la formation de nodules. Au sein des nodules, la bactérie différenciée en bactéroïde transforme l'azote de l'air en une forme directement assimilable par la plante. En échange, la plante fournit à la bactérie les substrats carbonés issus de la photosynthèse.

On distingue trois sous familles des légumineuses (Fabaceae): Mimosoideae, Caesalpinioideae et Papillioideae. Dans notre cas d'étude on s'intéresse à la dernière sous famille, qui sera focalisée particulièrement sur le genre *Pisum* qui fait partie de la sous famille Papillioideae. Cette dernière est composé de deux espèces avec une répartition très étendue dans le monde, *Pisum fulvum* et *Pisum sativum* L. (Itis, 2013).

Nous nous sommes intéressées au cours de ce travail à étudier la diversité des bactéries, nodulant la légumineuse *Pisum sativum* L., par une caractérisation morphologique et culturale des isolats suivie d'une caractérisation symbiotique et phénotypique (tests biochimiques, physiologiques et nutritionnels).

Chapitre 1

Etude

bibliographique

1. Cycle de l'azote

La vaste majorité de l'azote est présente dans l'atmosphère sous forme élémentaire. Cet azote atmosphérique est transféré vers la surface de la terre par le processus de fixation d'azote. Celle-ci est effectuée en grande partie par des bactéries et en partie par les éclairs. Depuis peu, la fixation anthropique d'azote à l'aide du procédé de Haber-Bosch contribue à peu près autant que les processus naturels. L'azote fixé l'est sous forme d'ammoniac NH_4^+ (UVED, 2008).

À la suite de sa fixation, l'azote sous forme d'ammoniac est oxydé par des bactéries nitrificatrices en NO_2^- et NO_3^- . Ces formes minérales d'azote peuvent être absorbées par la végétation et sont transformées en composés organiques, principalement des protéines, des bases des acides nucléiques et de la chlorophylle. Puisque les formes minérales de l'azote sont hautement solubles et mobiles dans les sols, une partie est exportée par le ruissellement et la percolation vers le réseau hydrologique. En milieu aquatique, les nitrates, nitrites et l'ammoniac sont utilisés par des bactéries et par le phytoplancton (UVED, 2008).

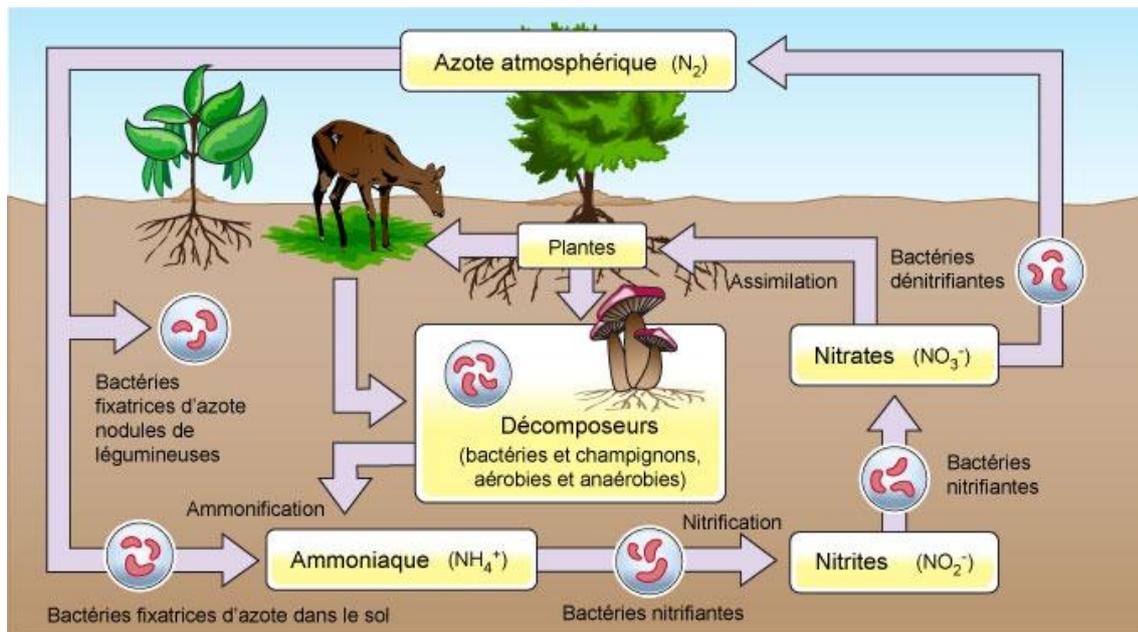


Figure 1 : Processus microbiens impliqués dans le cycle de l'azote (UVED, 2008).

L'azote absorbé par les plantes est ensuite transféré vers les producteurs secondaires. Comme l'azote est un élément essentiel, il a tendance à s'accumuler le long de la chaîne trophique. Lors de l'absorption de l'azote par les organismes, il s'effectue un fractionnement isotopique qui discrimine envers l'azote plus lourd.

Durant la décomposition de matière organique, les procédés chimiques inverses se produisent. En milieu anoxique, des bactéries dénitrificatrices réduisent les nitrates et nitrites en azote moléculaire qui est retourné vers l'atmosphère. À travers d'autres processus bactériens, le nitrate est réduit en nitrite et de là en ammoniac ou en dioxyde d'azote. Un autre processus bactérien, la fixation anaérobie d'ammonium produit de l'azote à partir d'ammonium et de nitrites. Ce processus est surtout important dans les océans. Les formes ioniques de l'azote sont facilement solubles et donc très mobiles. Une quantité importante d'azote est ainsi transportée vers les cours d'eau et vers les océans. Les réactions impliquées dans le cycle aquatique de l'azote sont les mêmes qu'en milieu terrestre (UVED, 2008).

1.1. La fixation d'azote

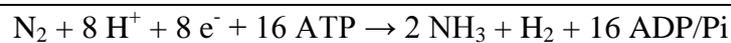
Les ressources en azote de la planète sont pratiquement illimitées grâce au réservoir atmosphérique (N_2). Pourtant l'azote est, après l'eau, le principal facteur limitant la croissance des végétaux. En effet, pour être utilisable par les végétaux, l'azote doit être sous forme minérale (NH_4^+ et NO_3^-), ce qui peut se réaliser par deux voies : la voie de la fixation biologique et la voie industrielle de synthèse des engrais azotés. La fixation biologique de N_2 a représenté, jusqu'au début du XX^e siècle, la seule source d'azote combiné de notre planète et représente encore aujourd'hui, à l'échelon mondial, un apport environ 1,5 fois supérieur à celui des engrais. Elle est estimée à environ 195 millions de tonnes d'azote par an (Smil, 2002).

Cette fixation biologique, découverte à la fin du XIX^e siècle, est uniquement le fait de procaryotes (bactéries ou cyanobactéries), qui vivent à l'état libre ou en association avec certaines plantes. Ces bactéries sont capables de réduire l'azote gazeux en ammoniac (NH_3), qui est transformé en ammonium (NH_4^+). L'ion ammonium sera incorporé immédiatement dans divers types d'acides aminés. Cette réaction - analogue à celle mise en œuvre industriellement dans la production d'engrais azotés - se fait, par contre, sous des conditions normales de température et de pression, grâce à la nitrogénase, qui est un complexe enzymatique particulier et de nature comparable chez tous les organismes fixateurs. Cependant, la réduction de l'azote atmosphérique est un processus très coûteux en énergie. Les organismes fixateurs d'azote doivent donc trouver dans leur environnement de grandes quantités de carbone, qu'ils se procurent :

- directement via la plante dans le cas d'associations plantes-microorganismes,
- indirectement via la matière organique du sol pour les organismes fixateurs libres (Smil, 2002).

Dans les sols, on constate en général que les bactéries fixatrices libres ne jouent qu'un rôle mineur. Par contre, dans le cas d'une association avec un végétal, la fixation d'azote bénéficie directement des photosynthétats de la plante et on obtient alors un système très performant. Cette association se traduit par la formation d'organes nouveaux, les nodosités, situées le plus souvent sur le système racinaire, dans lesquelles les bactéries se multiplient et réduisent l'azote de l'air. La plante hôte fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, cèdent l'azote fixé à la plante. On a donc bien une symbiose, c'est-à-dire une association à bénéfice réciproque (Smil, 2002).

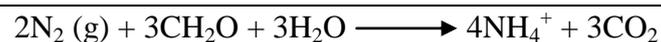
La fixation d'azote réduit l'azote atmosphérique en ammoniac. Il s'agit d'un processus endotherme rendu possible par l'enzyme nitrogénase.



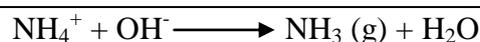
1.2. Ammonification

L'azote protéique microbien amené par la fixation va être minéralisé ainsi que les protéines des végétaux et animaux faisant retour au sol après leur mort (par phénomène de putréfaction qui est une décomposition bactérienne d'un cadavre, d'un organisme mort) et donner un terme final de l'ammoniac (Madigan et *al.*, 2007).

La réaction chimique type est :



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



La réaction nécessite un apport d'énergie de la photosynthèse.

1.3. Nitrification

La nitrification, est l'oxydation de NH_3 en NO_3^- , couramment réalisée dans les sols bien drainés, à pH neutre, suite à l'activité des bactéries nitrifiantes (Madigan et *al.*, 2007).

La première étape de la formation du nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite NO_2^- par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*. Le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter* selon les réactions suivantes (Hopkins, 2003):

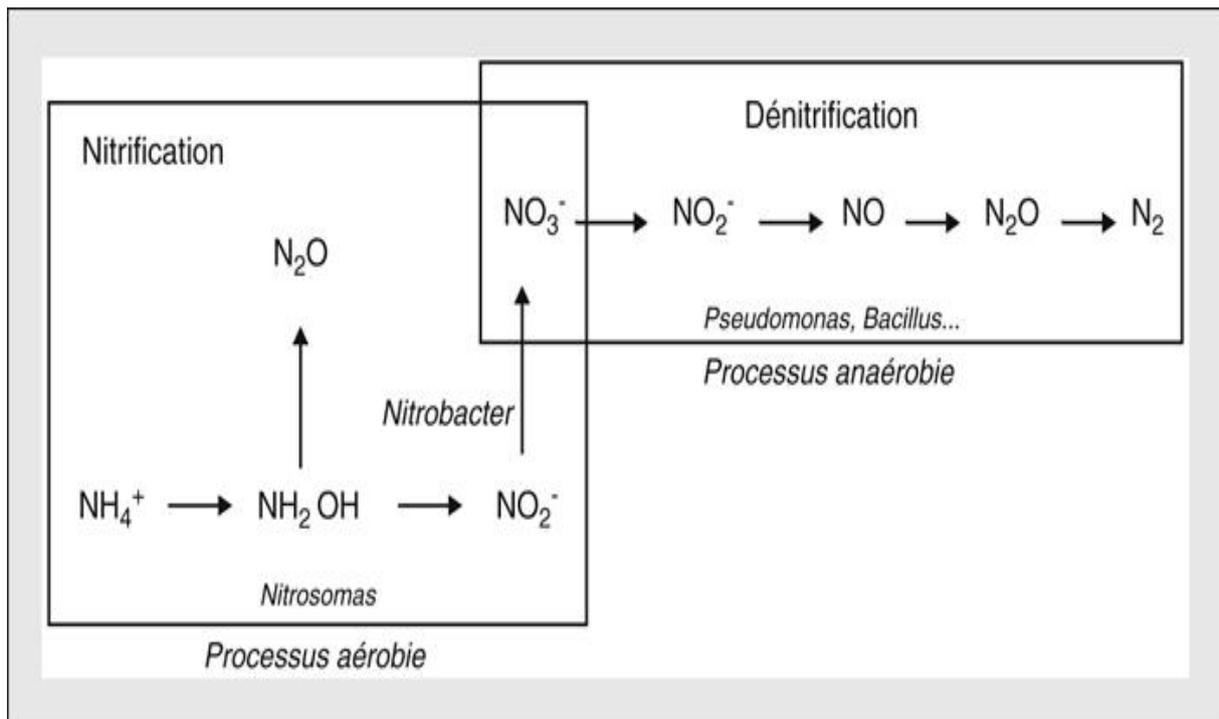
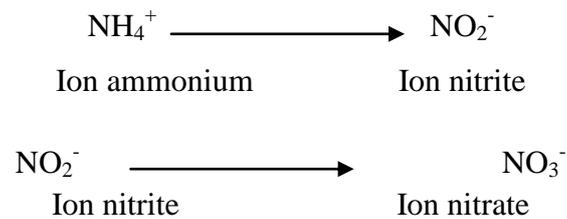


Figure 2 : Transformation de l'azote dans le sol par nitrification et dénitrification (Wrage et *al.*, 2001).

1.4. Dénitrification

Un processus anaérobie au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux N_2 et l'oxyde d'azote N_2O , qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.*, 2007). C'est la principale voie de formation biologique de N_2 . De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Paracoccus* et *Pseudomonas*. (Madigan *et al.*, 2007).

2. Symbiose légumineuse/rhizobia

La symbiose entre les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries nodulant les légumineuses (exemple des rhizobia) est une des plus efficaces en termes de fixation azotée. Ainsi, les légumineuses cultivées en association avec leurs symbiotes fixent 40 à 60 Mt d'azote par an, tandis que 3 à 5 Mt d'azote sont fixées par les légumineuses des écosystèmes naturels (Graham et Vance, 2003).

Chaque année, les légumineuses associées à leur symbiote produisent autant d'azote que l'industrie mondiale des engrais. L'indépendance vis-à-vis des engrais azotés est particulièrement intéressante pour l'agriculture dite durable. La rotation des cultures avec les légumineuses permet d'économiser les engrais azotés, très coûteux en énergie fossile et contribuant à l'effet de serre via l'émission de grandes quantités d'oxyde nitrique (Crutzen *et al.*, 2007).

La symbiose légumineuse/rhizobia est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobia pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven *et al.*, 2007).

2.1. Les légumineuses

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles : Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae ou Faboideae (Doyle et Luckow, 2003) et compte environ 20.000 espèces (Gepts *et al.*, 2005).

Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000).

- **Les Caesalpinioideae** : Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd *et al.*, 2001).

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

- **Les Papilionoideae** : Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales: un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judy *et al.*, 2001).

Les *Papilionoideae* sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisum sativum* L.) et l'haricot (*Phaseolus vulgaris* L.); mais aussi pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage tels que la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le Sulla (*Hedysarum coronarium* L.).

Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles de céréales. Elles couvrent 66% des besoins de subsistance des communautés rurales dans les pays en voie de développement, tout en assurant un maintien durable de la fertilité des sols et de l'équilibre des écosystèmes. Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, les légumineuses produisent des protéines en abondance sans fertilisation azotée (FAO, 1996).

2.1.1. *Pisum sativum* L.

Le pois, *Pisum sativum* L., est une espèce du genre *Pisum* de la sous famille *Papilionoideae* des légumineuses (Fabaceae). Le genre *Pisum* ne comprend que quelques espèces et s'apparente au genre *Lathyrus*, *Lens* et *Vicia* (Brink et Beley, 2006 ; Cousin, 1992). Le pois est associé symbiotiquement à *Rhizobium leguminosarum* (Brink et Beley, 2006).

C'est une plante glabre, dressée, pouvant atteindre et dépasser 1m. Elle possède des feuilles paripennées à 1 et 3 paires de folioles ovales-oblongues plus ou moins dentées, terminés par une vrille. Les stipules sont plus ou moins orbiculaires aussi grandes ou plus grandes que les folioles, dentées-amplexicaule à la base. Les fleurs par 1-3 bleuâtres ou blanchâtres. Les calices à 5 dents foliacées et inégales les 2 supérieures sont plus courtes et

plus larges. 10 étamines diadelphes (9-1), à tube traqué transversalement. Les gousses de forme cylindrique, se terminent en bec, polyspermes (Quezel et Santa, 1962).



Photographie 1: La plante du pois fourragé *Pisum sativum* L. (Anonyme, 2014).

2.2. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)

Ce sont des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnets, non sporulantes, mobiles. Pouvant exister sous deux formes : la forme végétative que l'on trouve dans le sol et la forme bactéroïde que l'on rencontre à l'intérieur des cellules des cortex racinaires (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les milieux au mannitol et aux extraits de levure (YMA) sont les plus utilisés pour la culture de ces bactéries (Allen et Allen, 1950). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes (Vincent, 1970). Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH compris entre 6 et 7 (Somasegran et Hoben, 1994).

2.2.1. Taxonomie des BNL

Les BNL sont des bactéries appartenant aux différents genres et classes taxonomiques, ainsi les genres appartenant à la classe des α -protéobactéries sont représentés dans les genres suivants : *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Rhizobium* (Frank, 1889), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Mesorhizobium* (Javis et al., 1997), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) , ce genre est maintenant appelé *Ensifer* (Yong, 2003), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005) ,

Devosia (Rivas et al, 2003), *Ochrobactrum* (Zurdo-Pineiro et al., [2007](#)), *Methylobacterium* (Jourant et al., 2004) et *Microvigna* (Ardley et al.,2012) qui est un nouveau genre.

La classe des β -protéobactéries renferme les genres *Burkholderia*, *Cupriavidus* anciennement appelé *Wautersia* (Moulin et al., 2001), *Herbaspirillum* (valverde et al., 2003) et *Shinella* (Lin et al., 2008).

Tableau 1: Les derniers remaniements de la classification des BNL selon Weir, BS (2012) dont la dernière mise à jour du 2 Mai 2013.

Genre	Espèces	Références
<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. (2009)
	<i>Rhizobium alkalisoli</i>	Lu et al. (2009b)
	<i>Rhizobium cellulosityticum</i>	García-Fraile et al. (2007)
	<i>Rhizobium daejeonense</i>	
	<i>Rhizobium endophyticum</i>	López-López et al. (2011)
	<i>Rhizobium etli</i>	
	<i>Rhizobium galegae</i>	
	<i>Rhizobium gallicum</i>	
	<i>Rhizobium giardinii</i>	
	<i>Rhizobium hainanense</i>	
	<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al. (2011b)
	<i>Rhizobium huautlense</i>	
	<i>Rhizobium indigoferae</i>	
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Espèce type.
	<i>Rhizobium loessense</i>	Anciennement <i>Rhizobium huanglingense</i>
	<i>Rhizobium lusitanum</i>	
	<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al. (2009)
	<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu et al. (2008)
	<i>Rhizobium mongolense</i>	
	<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han et al. (2008)
	<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al. (2008)
	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)	
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al. (2009)	
<i>Rhizobium sullae</i>	Anciennement <i>Rhizobium hedysari</i>	

	<i>Rhizobium tropici</i>	
	<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al. (2011)
	<i>Rhizobium undicola</i>	Anciennement <i>Allorhizobium undicola</i>
	<i>Rhizobium vignae</i>	Ren et al. (2011)
	<i>Rhizobium yanglingense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium albiziae</i>	Wang et al. (2007)
	<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Chen et al. (2010)
	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
	<i>Mesorhizobium australicum</i>	Nandasena et al. (2009)
	<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Chen et al. (2011)
	<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Wang et al. (2007)
	<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Anciennement <i>Rhizobium ciceri</i>
	<i>Mesorhizobium gobiense</i>	Han et al. (2008b)
	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Anciennement <i>Rhizobium huakuii</i>
	<i>Mesorhizobium loti</i>	Anciennement <i>Rhizobium loti</i> , espèce type
	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Anciennement <i>Rhizobium mediterraneum</i>
	<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Vidal et al. (2009)
	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Nandasena et al. (2009)
	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	
	<i>Mesorhizobium robiniae</i>	Zhou et al. (2010)
	<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Lu et al. (2009)
	<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
	<i>Mesorhizobium tarimense</i>	Han et al. (2008b)
	<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Anciennement <i>Rhizobium tianshanense</i>
<i>Ensifer</i>	<i>Ensife rabri</i>	
	<i>Sinorhizobium americanum</i>	
	<i>Ensifer arboris</i>	
	<i>Ensifer fredii</i>	Anciennement <i>Rhizobium fredii</i> , espèce type de <i>Sinorhizobium</i>
	<i>Ensifer garamanticus</i>	Merabet et al. (2010)
	<i>Ensifer indiaense</i>	
	<i>Ensifer kostiensis</i>	
	<i>Ensifer kummerowiae</i>	

	<i>Ensifer medicae</i>	
	<i>Ensifer meliloti</i>	Anciennement <i>Rhizobium meliloti</i>
	<i>Ensifer mexicanus</i>	Lloret et al. (2007)
	<i>Sinorhizobium morelense</i>	
	<i>Ensifer adhaerens</i>	
	<i>Ensifer numidicus</i>	Merabet et al. (2010)
	<i>Ensifer saheli</i>	
	<i>Ensifer sojae</i>	Li et al. (in press)
	<i>Ensifer terangae</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	
	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	Anciennement <i>Blastobacter denitrificans</i> ;
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	
	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Islam et al. (2008)
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Anciennement <i>Rhizobium japonicum</i> , espèce type
	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	
	<i>Burkholderia mimosarum</i>	
	<i>Burkholderia nodosa</i>	Chen et al (2007)
	<i>Burkholderia phymatum</i>	
	<i>Burkholderia sabiae</i>	Chen et al (2008)
	<i>Burkholderia tuberum</i>	
<i>Phyllobacterium</i>	<i>Phyllobacterium trifolii</i>	
	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	Mantelin et al. (2006)
	<i>Phyllobacterium leguminum</i>	Mantelin et al. (2006)
<i>Microvirga</i>	<i>Microvirga lupini</i>	Nouvelle: Ardley et al. (2012)
	<i>Microvirga lotononidis</i>	Nouvelle: Ardley et al. (2012)
	<i>Microvirga zambiensis</i>	Nouvelle: Ardley et al. (2012)
<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Espèce type
	<i>Azorhizobium doebereinae</i>	anciennement <i>Azorhizobium johanna</i>
<i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	(Zurdo-Piñero et al. 2007)
	<i>Ochrobactrum lupini</i>	

<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium nodulans</i>	
<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	
<i>Devosia</i>	<i>Devosia neptuniae</i>	
<i>Shinella</i>	<i>Shinella kummerowiae</i>	

2.3. La nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo *et al.*, 2008b ; Lohar *et al.*, 2009).

2.3.1. Les étapes de la nodulation

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000; Limpens et Bisseling 2003) (Figure 4).

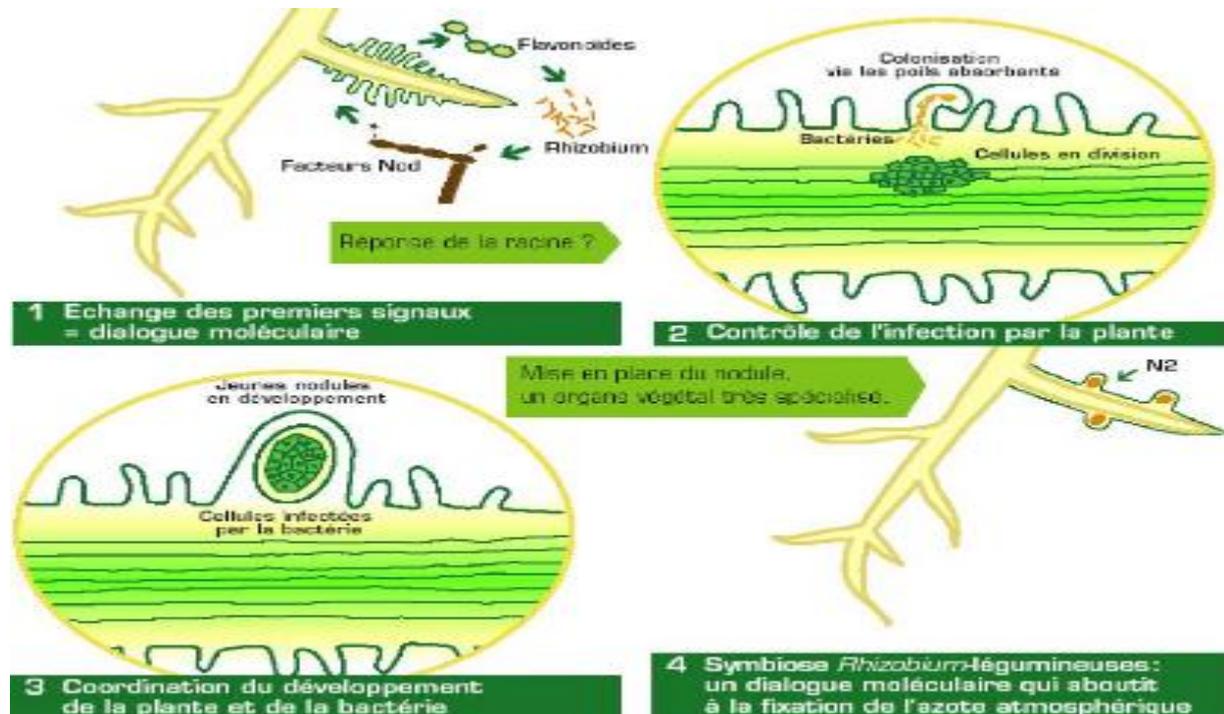


Figure 3: Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).

2.3.1.1. Echange de signal d'infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Certaines d'entre elles appartiennent au groupe des flavonoïdes tels que les flavones, isoflavones, flavonones (Rasanen, 2002). Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'activation des gènes *nod* et la synthèse des lipo-chitooligosaccharides (LCOs) (Dénarié *et al.*, 1996) émis par la bactérie qui sont à leur tour à l'origine de l'activation d'autres gènes végétaux ou bactériens (Bladrgroen et Spainkc, 1998). Ces LCOs ont été nommés facteurs Nod et sont responsables de changements physique et physiologique chez la plante hôte, comme la déformation des racines, la division cellulaire et l'organisation du primordium nodulaire. Les gènes *nod* sont déterminants dans la spécificité de l'hôte (Denarié 1992; Geurts *et al.*, 2005; Mulder *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006)

2.3.1.2. Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Dardanelli et *al.*, 2003; Perry et *al.*, 2004). Les facteurs Nod émis par les rhizobia, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de Ca^{2+} . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques (Pelmont, 1995; Gage, 2004) et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les rhizobia (Esseling et *al.*, 2003).

L'infection qui s'accompagne d'une digestion de la paroi cellulaire du poil racinaire peut avoir lieu à travers les poils absorbants, les blessures, ou l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002).

2.3.1.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Une fois que les parois des cellules de poils sont digérées, une structure tubulaire appelée le fil d'infection est formée. Elle se compose de cellules de la paroi nouvellement synthétisée qui formeront le matériel entourant le *Rhizobium*. Le centre du tube est une glycoprotéine contenant quelques produits bactériens et quelques glycoprotéines de la plante hôte (Gage, 2004).

Ces changements majeurs dans la forme des cellules et la croissance dirigée sont causées par des altérations significatives dans le cytosquelette de la plante. La dépolymérisation de l'actine est l'un des effets observés dans les poils absorbants suite à l'exposition au facteur Nod (Gage et Margolin, 2000).

Les bactéries prolifèrent à l'intérieur du cordon et vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales, via ce cordon, provoquant ainsi l'apparition du méristème dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes ou endosymbiose (Lindström et *al.*, 2002).

Ces dernières, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod, par contre les bactéroïdes se concentrent dans la production des nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique. Les bactéroïdes sont séparés du cytoplasme végétal par une membrane

spéciale «péri bactéroïdes» ou membrane de séquestration servant de plaque d'échange entre les bactéries et les cellules de la plante hôte. Dans cette membrane les bactéries différenciées forment les bactéroïdes de fixation de l'azote (Pelmont, 1995; Corbière, 2002).

Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments appelés « leghémoglobine », synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Corbière, 2002). L'action de la leghémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Rasanen, 2002; Simms et Taylor, 2002).

2.4. Génétique de la fixation

La formation des nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante. (Michelle, 2006).

2.4.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées répondues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guigniard, 1996).

2.4.2. le gène *nodD*

Les gènes de nodulation ne sont exprimés que par l'action d'un activateur de transcription, le *nod D*. Ce dernier est exprimé de manière constitutive (Geurts et Bisseling, 2002), il est activé par des molécules produites par les plantes telles que les flavonoïdes (Spaink, 1987; Zuanazzi *et al.*, 1998). Les protéines NodD synthétisées vont se lier à la *nod*-box, lieu de régulation des gènes *nodA*, *B* et *C*. Avec la coopération des flavonoïdes, les protéines NodD vont pouvoir promouvoir l'expression des gènes *nod A*, *B* et *C* : les protéines NodD ont un site de liaison pour les flavonoïdes ; une fois les flavonoïdes liés aux protéines NodD ces derniers, liées à la *nod*-box, sont capables d'induire la transcription de ces gènes. La polymérase se fixe alors sur le promoteur de ces gènes, ces derniers sont transcrits, et les protéines *NodA*, *B* et *C* sont traduites (Michelle, 2006).

2.4.3. Les gènes *nif*

La transcription des gènes de la fixation de l'azote (gènes *nif*) n'a lieu que dans des conditions physiologiques bien définies qui dépendent des propriétés des bactéries

concernées. Les signaux majeurs intervenant dans cette régulation sont l'ammoniaque et l'oxygène. Dans la majorité des cas l'expression des gènes *nif* dépend d'un activateur de la transcription appelé NifA et d'un facteur sigma spécifique, produit de *rpoN*, qui reconnaît des promoteurs particuliers en amont des opérons *nif*. De grandes variations existent, selon les genres bactériens (Michelle, 2006).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Isolement des bactéries nodulant le pois fourrager

1.1 Les sites d'échantillonnage et origine des graines

La collecte des nodules est réalisée à partir du système racinaire de la plante *Pisum sativum* L. cultivée dans trois zones écoclimatiques différentes : continentale, semi-aride et littorale de l'Est et Centre Algérien. Les nodules étudiés dans notre travail ainsi que les graines de la variété Séfrou proviennent d'une collection de notre rapporteur Mlle Gaci Meriem.

1.2 Conservation des nodules

Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congelés afin d'éviter la destruction des bactéries par les cristaux de glace). Pour une longue conservation, la méthode recommandée par Vincent (1970) consiste à utiliser une dessiccation avec le chlorure de calcium (CaCl_2), ainsi les nodules peuvent être conservés jusqu'à 6 à 12 mois. La dessiccation empêche la croissance des champignons. La conservation des nodules se fait dans un flacon en verre contenant du CaCl_2 , du coton (environ 1cm au-dessus du CaCl_2), en dernier on ajoute les nodules. Le volume du flacon utilisé ne doit pas dépasser les 3/4 du volume total. Chaque flacon doit être étiqueté pour indiquer le nom de la plante, la date de conservation, et le lieu de collecte. Les flacons sont mis immédiatement au réfrigérateur à 4°C. (Figure 4)

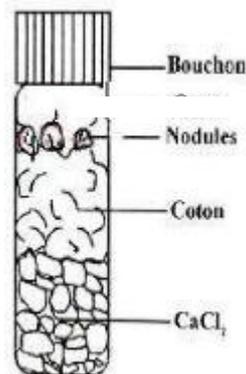


Figure 4: Conservation des nodules.

1.3 Isolement des bactéries

La technique utilisée est celle préconisée par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994), qui consiste à :

a) Désinfection des nodules : Les nodules déshydratés dans de l'eau distillée pendant une nuit. Ils sont ensuite désinfectés par immersion dans l'éthanol (95%) pendant 3 à 10 secondes, puis dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 3 minutes, les nodules sont ensuite rincés abondamment à l'eau distillée stérile.

b) Isolement des bactéries : Dans une boîte de Pétri stérile, on dépose quelques gouttes d'eau distillée stérile séparément, dans chacune d'elles un nodule sera écrasé avec une pince stérile. Une ôse du broyat nodulaire est prélevée puis ensemencée sur les milieux de culture Glucose Peptone Agar additionné de Pourpre de Bromo-Crésol (GPA+BCP) et Yeast Mannitol Agar contenant le rouge Congo (YMA+RC) (Annexe1), l'ensemencement est réalisé par stries selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies bien séparées (Figure 5), les boîtes de Pétri ensemencées sont incubées à une température de 28° C pendant 48h à 3 jours.

Un nodule non écrasé est ensemencé sur une boîte de YMA+RC afin d'affirmer la bonne stérilisation des nodules.

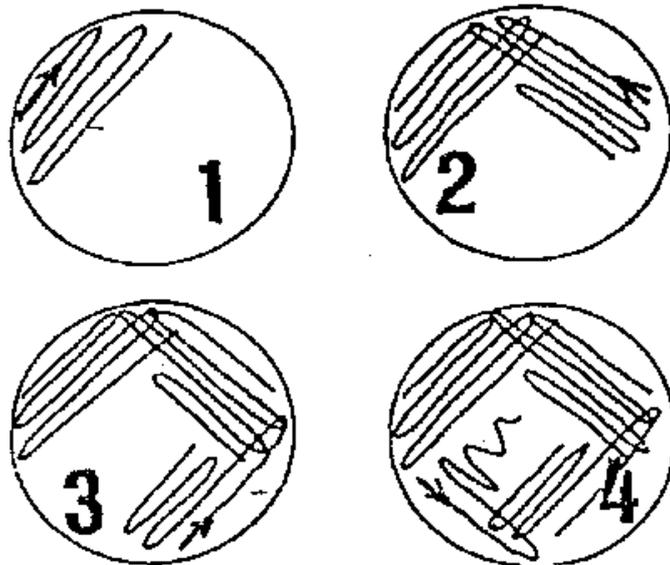


Figure 5: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

c) Purification des isolats : Des repiquages successifs ont été nécessaires pour leur purification, en ensemençant les colonies à purifier sur le milieu YMA additionné de RC jusqu'à l'obtention des souches pures. La pureté des souches est vérifiée aussi par la coloration de Gram (Annexe 2).

d) Conservation des isolats : La conservation des isolats se fait sur le milieu YMA additionné de CaCO_3 (1,5g/l) comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

2. Test de nodulation

Le but de ce test est d'identifier nos isolats et d'évaluer leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent 1970). Ce test consiste à inoculer des graines germées de la plante hôte avec les différents isolats.

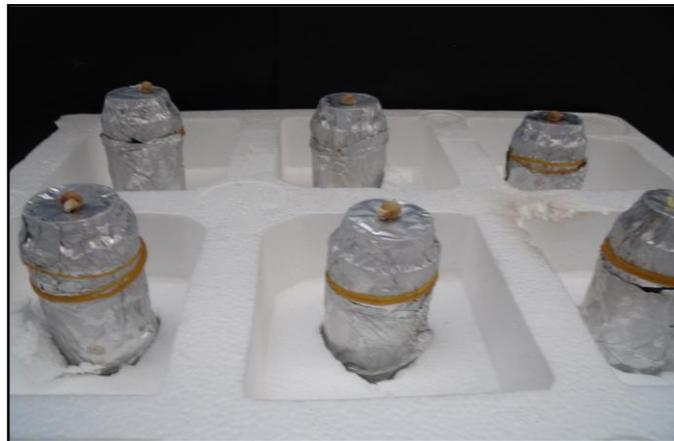
2.1. Désinfection et germination des graines

Avant de procéder à la stérilisation des graines, il faut tout d'abord les sélectionner, elles doivent être non endommagées et de taille identique, la stérilisation se fait par la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Sous la hotte à flux laminaire (KOTTERMAN 8511) et dans un flacon stérile, les graines sont immergées dans l'éthanol à 95° pendant 10 sec, ensuite il est remplacé par l'acide sulfurique concentré H_2S avec agitation manuelle pendant 3min pour induire la scarification. Une fois cette période est achevée, elles sont rincées à l'eau distillée stérile plusieurs fois, ensuite elles sont laissées gonfler lors du dernier rinçage pendant 1 heure. Les graines stériles sont mises en germination sur boîtes de Tryptone Yeast Agar (TYA) (Beringer, 1974) (Annexe 1) enveloppées avec du papier aluminium et incubées à température ambiante pendant 3 à 4 jours.

2.2. Préparation des tubes

Les graines germées ont été transférées dans des tubes à essais de 30 mm de diamètre remplis de solution nutritive de fahraeus, un ruban du papier kraft est placé dans chaque tube dont le but est de maintenir les racines contre la paroi du tube. Les tubes sont fermés par le papier aluminium perforé par deux trous, l'un par lequel on introduit la racicelle de la graine germée et l'autre permettant l'introduction de l'inoculum (photo 2). Ce système permet de visualiser aisément le système racinaire et la nodulation des plantes. L'inoculum bactérien liquide a été apporté aseptiquement à raison de 2ml (10^7 cellules) par graine dès l'apparition des racines latérales. Les plantes ont été cultivées en chambre de culture (photopériode 24H/24). L'apparition des nodules a été surveillée par l'observation des racines.



Photographie 2: La culture des plantes en tubes à essai.

3. Caractérisation phénotypique des isolats

3.1. Tests biochimiques

Le but de ces tests est la recherche de certaines enzymes qui jouent un rôle important dans la symbiose entre les légumineuses et les bactéries telque la cellulase, et d'autre enzymes spécifiques nécessaires pour la croissance des BNL dans le sol tel que la nitrate réductase l'uréase

3.1.1. Hydrolyse de l'urée

L'hydrolyse de l'urée est une réaction enzymatique qui ne peut s'effectuer qu'en présence d'uréase, enzyme «coupant» la molécule d'urée. Cette réaction est très complexe. L'uréase est produite par les bactéries uréolytiques. Ces dernières sont présentes dans le sol (Williams et *al.*, 1984; Yameogo et *al.*, 1993).

Les isolats et la souche de référence sont cultivés sur 2ml de milieu urée indole, et après 48h d'incubation à 28°C dans l'étuve, la réaction positive se manifeste par un virage de couleur au rose violée (rose fuchsia).

3.1.2. Réduction des nitrates

Cette étude consiste à mettre en évidence la production d'une enzyme: la nitrate-réductase par les bactéries. Nos isolats sont cultivés sur le bouillon TY (Annexe1) contenant 0,1% de KNO₃(w/v), et sont incubés pendant 4 jours à 28°C. Après la période d'incubation quelques gouttes des réactifs 1 et 2 de la nitrate réductase (Annexe1) sont ajoutés au milieu.

L'apparition d'une coloration rouge ou rose indique que les nitrates sont réduits en nitrites. En absence de coloration, on ajoute au milieu la poudre de zinc qui a la capacité de réduire les nitrates en nitrites. Si les nitrates sont toujours présents dans le milieu, ils vont être réduits sous l'effet du zinc et la coloration apparaîtra, la réaction est donc réellement négative. Et si les nitrates ont été réduits par les isolats en azote gazeux (N₂), le milieu ne contient plus les nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la couleur du milieu n'est pas modifiée (Euzéby, 2007; Delarras, 2007).

3.1.3. Activité cellulolytique

L'enzyme carboxyméthylcellulase endo B-1,4-Dglucanase ou (CMCase) est l'une parmi les enzymes qui peuvent être synthétisées par les Bactéries Nodulant les légumineuses (BNL). La présence d'une activité endoglucanasique est mise en évidence dans le milieu YMA contenant 0,25% (w/v) de CMC. Après 5 jours d'incubation à 28°C, les boîtes sont rincées avec l'eau courante puis inondées d'une solution de RC (1mg/ml) et incubées à l'étuve pendant 30min à 28°C, le colorant est ensuite remplacé par une solution de NaCl 1M. Les boîtes sont ensuite abandonnées à température ambiante pendant 30min. Un halo jaune orangé entourant les colonies indique la présence de l'enzyme (struffi et *al.*, 1998).

3.2. Tests nutritionnels

3.2.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les isolats et la souche témoin ont été mis en culture sur YMA (Annexe1) en remplaçant le mannitol par 0,1% (w/v) des sucres suivants: Fructose, Galactose, Glucose, Lactose ou Maltose. La quantité de l'extrait de levure est diminuée à 0,05g/l (Somasogaran et Hoben, 1994). Le témoin est réalisé avec le mannitol dans des conditions standards. Les boites sont incubées à 28°C pendant 48 à 72heures.

3.2.2. Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote

Les isolats et la souche témoin ont été cultivés sur milieu Défini8 (Vincent, 1970) (Annexe1) où le Glutamate de Sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants: Valine, Proline, Isoleucine, Tryptophane, Glycine, Sérine, Histidine, Méthionine, Leucine, Tyrosine, Cystéine et Arginine. L'incubation des boites se fait à 28°C pendant 48 heures.

3.2.3. Besoins en vitamines

Le milieu BIII (Dazo, 1982) (Annexe 1) est utilisé pour étudier les besoins des bactéries en vitamines, la solution stock de vitamines est remplacée par une solution stock contenant l'une des vitamines suivantes : Pantothénate de Ca, Thiamine HCL, Mélange thiamineHCL+ Pantothénate de Ca. L'utilisation de chaque vitamine est estimée en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm, après 24 et 48h d'incubation à 28°C.

3.3. Tests physiologiques (facteurs intrinsèques)

3.3.1. Tolérance au NaCl

Les isolats et la souche témoin sont cultivés sur le milieu de Gloux et Le Rudulier (1989) (Annexe1) à différentes concentrations de NaCl: 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%. La croissance bactérienne est estimée par la mesure de la densité optique à 600nm après 24 et 48h d'incubation à 28°C.

3.3.2. Effet du pH

Les isolats et la souche témoin sont cultivés sur le milieu YMB ajusté à différents pH: 4, 5, 6, 8 et 10. La croissance des souches est estimée par la mesure de la DO à 600nm après 24 et 48 heures d'incubation à 28°C. Les résultats sont comparés au témoin ajusté à pH 6,8.

3.3.3. Effet de la température

Les isolats et la souche témoin sont cultivés sur le milieu YMA et incubés pendant 3 jours à différentes températures: 4, 28, 37, 44 et 55°C. L'incubation des boîtes à 4°C peut aller jusqu'à 10 jours.

3.3. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

C'est une technique de criblage, connue pour son important pouvoir de discrimination, permet de distinguer les espèces bactériennes et même des souches au sein d'une même espèce. Elle peut être utilisée à des fins analytiques ou préparatifs, et est relativement rapide, peu coûteuse et reproductible (Benguedouar, 2000 ; Ndiaye et *al.*, 2002).

3.3.1.Principe

Le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa longueur. Les complexes SDS-protéines qui se forment sont chargés. Donc, dans des séparations dénaturantes de SDS-PAGE, la migration est déterminée non pas par la charge intrinsèque du polypeptide, mais par le poids moléculaire exprimé en Daltons (Coyne et *al.*, 2002). La séparation des protéines d'une souche bactérienne par SDS-PAGE donne un profil ou un électrophorégramme caractéristique de la souche et reproductible si les techniques employées sont standardisées. Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente mais de mobilité identique (Ndiaye et *al.*, 2002).

3.3.2. Préparation des extraits protéiques

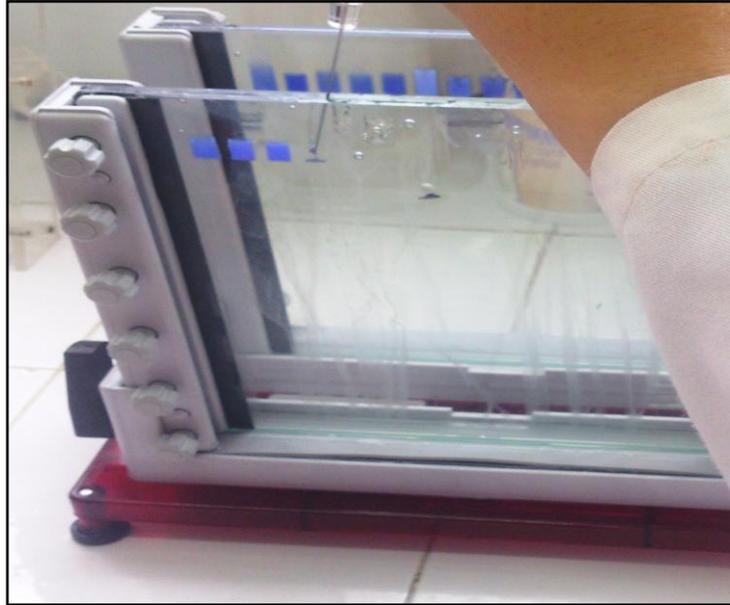
Une aliquote de 600µl de chaque culture bactérienne en phase de croissance exponentielle cultivée dans le milieu YMB est centrifugée à une vitesse de 10000 tours/min pendant 20 min. Le culot est mis en suspension dans 50µl de tampon de lyse et soumis à une électrophorèse sur gel.

3.3.3.Préparation des plaques de gel

- Montage des plaques
- Couler le resolving (gel de séparation) jusqu'à environ 4,5 cm du haut, recouvrir d'eau + butanol
- Une fois la polymérisation du gel est achevée, retirer l'eau + alcool et couler le stacking gel (gel de concentration) jusqu'à bord supérieur du verre.
- Placer rapidement le peigne.
- Laisser polymériser, démonter et retirer les peignes
- Placer 1 ou 2 plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir avec le tampon migration.

3.3.4.dépôts des échantillons et migration électrophorétique

Avant de déposer les échantillons, remplir les puits avec le tampon de migration, à l'aide d'une seringue Hamilton (100µl), un volume de 50µl de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puit (photo 3). La migration électrophorétique est réalisée en appliquant un ampérage constant de 80 mA et un voltage de départ de 127 V pour atteindre à la fin de migration la valeur de 287 V. La migration dure jusqu'à 5 heures et elle s'arrête lorsque le front formé par l'indicateur bleu de bromophénol arrive à 3-4mm de l'extrémité inférieur du gel.



Photographie 3: Dépôt des échantillons dans les puits

3.3.5. Révélation des bandes protéiques

Mettre le gel dans 200ml de solution de coloration pendant une nuit avec une légère agitation. La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par l'eau distillée jusqu'à la décoloration complète du gel et l'apparition des bandes protéiques.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Caractéristiques morphologiques et culturels des isolats

Sur un nombre total de nodules récoltés à partir des racines de la légumineuse *Pisum sativum* L. prélevée sur les différents sites de l'Est et Centre Algérien, nous avons tenu compte de 13 isolats dans cette étude (Tableau 2) qui ont été comparés avec la souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*.

Tableau 2 : Les isolats utilisés dans cette étude

	Isolats et souche de référence	Origine géographique de prélèvement	plante hôte	Source
Isolats	BOTN1	Boumerdess	<i>Pisum sativum</i> L.	Notre étude
	BOTN2			
	BOTN3			
	BOTN4			
	BATP1AN2	Batna		
	BATP1N3			
	BATP1N5			
	BATP2AN1			
	CTN2	Constantine		
	CTAN3			
	CTAN4			
	CTN7			
	Souche de référence	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		

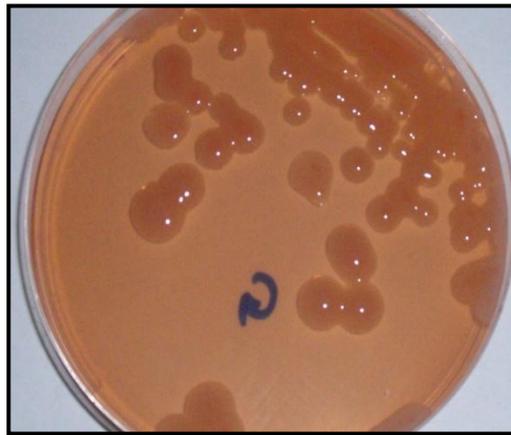
1.1 Croissance sur les différents milieux de cultures

1.1.1 Le milieu YMA + rouge Congo

L'ensemencement du jus nodulaire issu de l'écrasement des nodules a donné des colonies bactériennes qui absorbent peu le rouge Congo (Photo 4). Elles sont de couleur rose claire, ceci a été observé chez la majorité des rhizobia par Vincent (1970) et Jordan (1984). Cette propriété est

commune avec le genre *Bradyrhizobium*, par contre les contaminants absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984). Cependant l'isolat BATP1N5 absorbe fortement le rouge Congo ; ceci a été notamment observé chez quelques souches de *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. meliloti* qui sont de couleur blanche, rose claire ou foncée, orange et rouge incubés sur le milieu YMA+RC (Hahn, 1966 ; Bromfield et Jones, 1980 ; Kneen et Larue, 1983).

Toutes les colonies bactériennes obtenues sont translucides ou opaques ont une forme ronde à contour régulier, bombées d'aspect lisse et visqueux.



Photographie 4: Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA + rouge Congo.

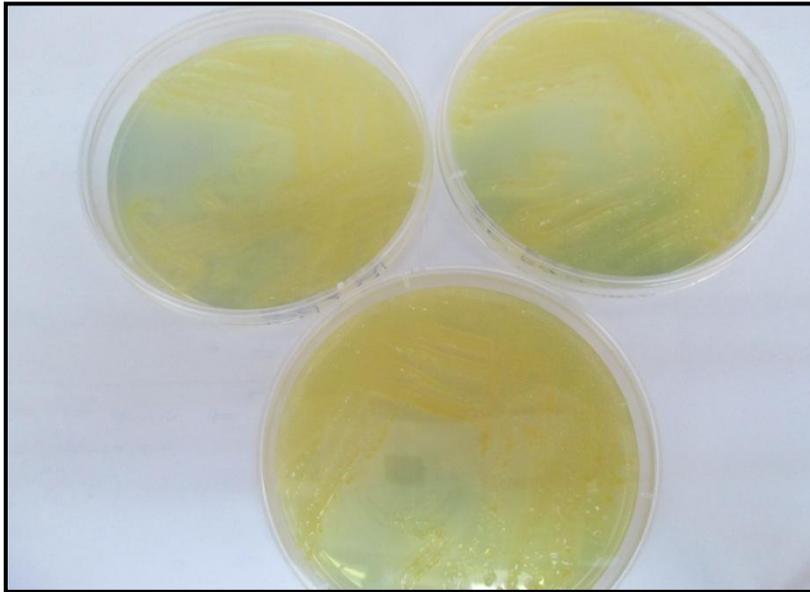
1.1.2 Bouillon YMB

Utilisé comme support d'ensemencement d'un milieu à un autre, c'est un bouillon qui permet d'enrichir les colonies sélectionnées et suspectées d'être *Rhizobium*. Une fois ensemencé et après 24h d'incubation à 28C° il se caractérise par l'apparition d'un trouble ce qui été observé au niveau de tout nos isolats y compris la souche de référence.

1.1.3 Croissance sur le milieu YMA contenant le BTB

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck et *al*, 1993; Pagano, 2008).

Dans cette étude on note l'apparition des colonies avec virage du milieu vers le jaune, indiquant une production d'acide estimée par l'indicateur de pH, ce qui confirme que les isolats sont à croissance rapide (photo5).



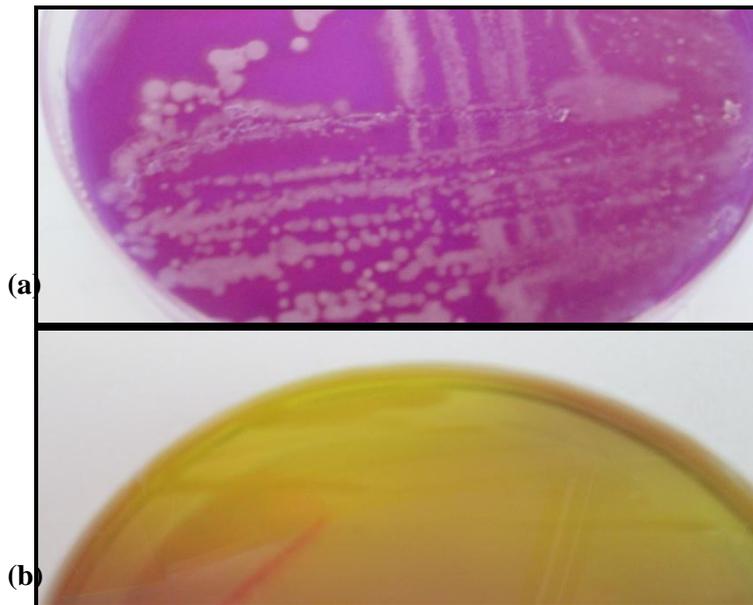
Photographie 5: Acidification du milieu YMA+BTB après 24 heures d'incubation.

1.1.4 Le milieu GPA+BCP

Les isolats BOTN2, CTAN3, BOTN1, CTN2, BATP1N3 ainsi que la souche de référence n'entraînent aucun virement de couleur du milieu après 72h d'incubation, une absence de croissance sur ce milieu a été observée chez les ces isolats, cette absence de croissance a été observée également chez les isolats de Riah (2001), isolés à partir des nodules du *Pisum arvense* L., ainsi que les isolats de Gaci (2010), isolés à partir des nodules issus du piégeage et des nodules issus de l'isolement direct du *Pisum sativum* L.

On note aussi le développement des colonies de couleur blanchâtre de forme ronde à contour régulier, bombées avec une alcalinisation du milieu après 72h d'incubation, correspondant à l'isolat BATP1N5, et BOTN3 (photo 6a)

Mais les isolats BOTN4, CTN7, BATP1N3, PATP1AN2, BATP2AN1 et CTN4 ont noté une acidification et un virage de couleur au jaune après 72h d'incubation (photo 6b).

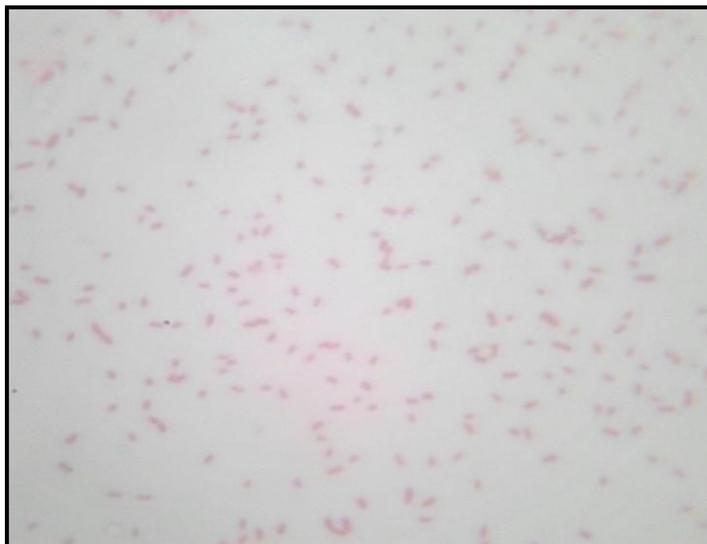


Photographie 6: Croissance des bactéries sur le milieu GPA+ BCP.

(a) Alcalinisation du milieu (b) : Acidification du milieu.

1.2 Examen microscopique

La coloration de Gram a révélé que l'ensemble des isolats testés sont des bactéries Gram (-) en forme de bâtonnets (photo7), la coloration de Gram a permis également de vérifier la pureté de la culture.



Photographie 7: Observation microscopique des bactéries (Objectif X100)

2. Test de nodulation

Chaque isolat a été testé pour sa capacité de former des nodules sur les racines de la légumineuse hôte (*Pisum sativum* L.). Après 4 semaines de croissance des plantes en tubes à essai (photo10), elles sont déterrées et les nodules formés sont dénombrés. Presque toutes les plantes étaient au stade de préfloraison mais il existe quelques unes qui ont pu atteindre le stade de floraison comme chez : la souche de référence. Les résultats ont montré que tous les isolats ainsi que la souche de référence ont pu noduler les racines de la plante hôte (photo11). (Tableau 3).



Photographie 8 : Germination des graines du pois fourrager après 3 jours d'incubation.



Photographie 9 : Croissance des plantes en tubes à essai

D'après les résultats obtenus, la nodulation est localisée, avec un pourcentage très élevé, sur les racines secondaires par contre les racines principales possèdent un très faible pourcentage comme le montre la figure 6.

La couleur des nodules observée est soit rose soit blanche, la taille est comprise entre 1 et 4 mm pour la plupart des cas, mais les nodules de l'isolat BOTN3 ainsi que ceux de la souche de référence peuvent atteindre jusqu'à 6mm. Le nombre moyen de nodules par pied est compris entre 23 et 85. L'isolat le plus infectif correspond à BOTN2 avec 85 nodules par pied. L'isolat le moins infectif, CTAN3, a pu induire la formation de 23 nodules.

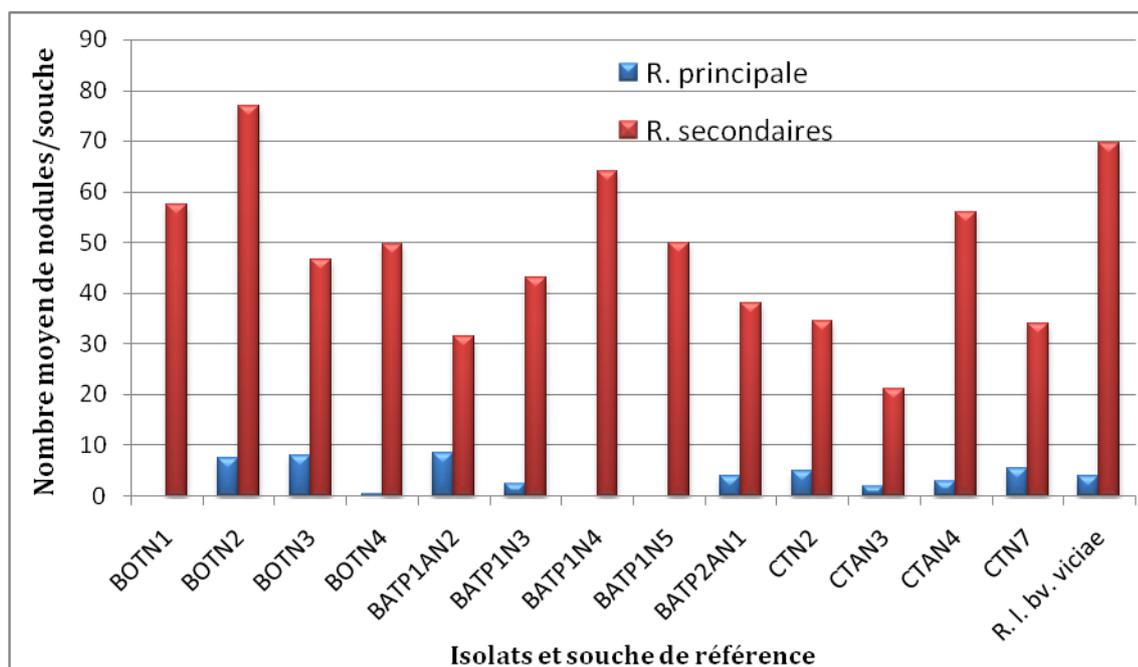


Figure 6 : Disposition des nodules sur les racines du pois fourrager

Tableau 3 : Nombre et caractéristiques des nodules produits sur chaque plante

Isolats	Pied	Nombre de nodules			Caractéristiques des nodules		Tailles des parties aériennes	Poids sec
		Nb. total	Rac Princip	Rac second	Taille	Couleur		
BOTN1	1	52	0	52	≤ 3mm	Blanche	47 cm	0,12g
	2	63	0	63	≤ 3mm	Blanche	40cm	0,20g
BOTN2	1	56	0	56	≤ 1mm	Blanche Rose et	63cm	0,13g
	2	113	15	98	≤ 6mm	blanche	76cm	0,15g
BOTN3	1	31	2	29	≤ 2mm	Blanche	31cm	0,06g
	2	78	14	64	≤ 1mm	Blanche	49,5cm	0,10g
BOTN4	1	49	1	48	≤ 1mm	Blanche	60cm	0,12g
	2	51	0	51	≤ 4mm	Blanche	85,5cm	0,23g
BATP1AN2	1	36	14	22	≤ 3mm	Rose et blanche	42 cm	0,13g
	2	44	3	41	≤ 5mm	Rose et blanche	36cm	0,10g
BATP1N3	1	27	5	22	≤ 2mm	Blanche	32cm	0,10g
	2	64	0	64	≤ 5mm	Blanche	36,5cm	0,10g
BATP1N4	1	33	0	33	≤ 4mm	Blanche	76cm	0,20g
	2	95	0	95	≤ 3mm	Blanche	54cm	0,09g
BATP1N5	1	36	0	36	≤ 2mm	Blanche	53cm	0,10g
	2	64	0	64	≤ 1mm	Blanche	72cm	0,17g
BATP2AN1	1	65	8	57	≤ 1mm	Blanche	44,4cm	0,10g
	2	19	0	19	≤ 2mm	Blanche	27cm	0,07g
CTN2	1	34	0	34	≤ 2mm	Blanche	67cm	0,13g
	2	45	10	35	≤ 4mm	Blanche	69cm	0,20g
CTAN3	1	27	2	25	≤ 2mm	Blanche	73cm	0,15g
	2	19	2	17	≤ 1mm	Blanche	49cm	0,07g
CTAN4	1	69	3	66	≤ 1mm	Blanche	27 cm	0,07g
	2	49	3	46	≤ 1mm	Rose et blanche	47 cm	0,13g
CTN7	1	45	11	34	≤ 2mm	Blanche	78cm	0,20g
	2	34	0	34	≤ 4mm	Blanche	94cm	0,25g
<i>R. l. bv. viciae</i>	1	87	8	79	≤ 6mm	Blanche	72cm	0,19g
	2	60	0	60	≤ 5mm	Blanche	72,5cm	0,18g
Témoin non inoculé	1	0	0	0	/	/	45cm	0,07g
	2	0	0	0	/	/	40 cm	0,06g



Photographie 10 : Racines nodulées par quelques isolats

A gauche : BATP1AN2 ; à droite : CTAN4



Photographie 11 : Racines nodulées par la souche de référence *R. l. bv. viciae*.

3. Caractérisation phénotypiques des isolats

3.1. Tests biochimiques

3.1.1. Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et *al* (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de coloration du milieu vers le rouge violacé.

Au coté de la souche de référence presque tous les isolats alcalinisent fortement le milieu par un virage de couleur de l'orangé au rouge violacé ou rose fuchsia mais la souche BOTN2 et BATP1N5 alcalinisent faiblement le milieu. L'alcalinisation de milieu indique la dégradation de l'urée et la libération d'ammoniac (Uréase +) (Tableau 4) comme dans l'équation (Guiraud, 1998) (photo 12).

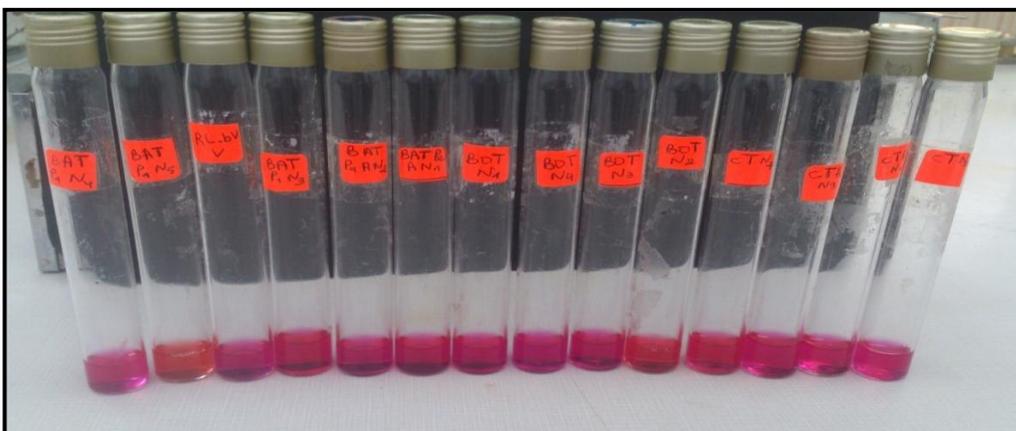


L'isolat BOTN4 a pu alcaliniser le milieu en quelques heures seulement. L'enzyme peut être « constitutive », c'est-à-dire présente dans la bactérie indépendamment de celle de l'urée : l'enzyme sera révélée très rapidement (quelques minutes à deux heures). Pour d'autres bactéries, la synthèse est induite par l'urée et la révélation peut donc demander plus de temps (Joffin et Layral, 2006).

Tableau 4: Activité enzymatique des isolats et de la souche témoin (Hydrolyse de l'urée)

Isolats et souche de référence	Alcalinisation du milieu
BOTN1	+++
BOTN2	++
BOTN3	+++
BOTN4	+++
CTN2	+++
CTAN3	+++
CTAN4	+++
CTN7	+++
BATP1AN2	+++
BATP1N3	+++
BATP1N4	+++
BATP1N5	+
BATP2AN1	+++
<i>R.l bv.viciae</i>	+++

+++ : forte alcalinisation, ++ : alcalinisation moyenne, + : faible alcalinisation

**Photographie 12:** Test de l'urase

3.1.2. Réduction des nitrates

Après 4 jours d'incubation nous avons additionné 3 à 4 gouttes des réactifs 1 et 2 de la nitrate réductase, appelés également le réactif de GRIESS, la couleur du milieu a viré au rouge pour les isolats BOTN1, BOTN2, BOTN3, CTN2, CTN7 et la souche de référence et pour le reste des isolats le milieu est toujours inchangé. Nous avons donc ajouté de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase, pour vérifier la présence des nitrates dans le milieu ou non. Après quelques minutes, l'apparition d'une teinte rouge pour les deux souches BATP1N3 et BATP1N5, signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc le résultat est véritablement négatif. Pour le reste des isolats BATP1AN2, BATP2AN1, BATP1N4, CTAN3, CTAN4, on n'observe aucun virement de la couleur, donc le milieu ne contient plus les ions nitrates indiquant ainsi un résultat positif.

La réduction **assimilatrice** est catalysée par la nitrate réductase B, qui conduit à des nitrites qui pourront être métabolisés par la suite en sels d'ammonium, l'ion NH_4^+ constituant une source d'azote utilisable. La réduction **dissimilatrice** ou « respiration nitrate » sous la dépendance de la nitrate réductase A et d'autres enzymes, les nitrates seront totalement réduits en oxyde nitreux (N_2O) et, surtout en azote (N_2) qui sera éliminé. La respiration nitrate est faite en anaérobie (Meyer et *al.*, 2004).

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (EL-Hilali, 2006). La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin et *al.*, 2006).

Lucinski et *al* (2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes.



Photographie 13: Réduction des nitrates.

3.1.3. Activité cellulolytique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose, l'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies indique la présence d'une endoglucanase (cellulase), presque tous les isolats ont présenté une réaction positive sauf la souche BOTN3 qui a un résultat négatif. Les résultats obtenus pour cette étude se sont en concordance avec ceux obtenus par Struffi *et al.* (1988).

Rhizobium leguminosarum sécrète deux glucanases extracellulaires, plyA et plyB, qui peuvent dégrader la carboxyméthylcellulose (CMC), qui est utilisée comme un substrat modèle de la paroi des polymères de cellulose de cellules végétales. Lorsqu'il est cultivé sur gélose, la dégradation de la CMC s'est produite seulement directement en dessous des colonies de *R. leguminosarum*, ce qui suggère que les enzymes restent attachés à la bactérie (Christine F *et al.*, 1998).

D'autres auteurs ont montré que le *Rhizobium* produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilite aux *Rhizobium* de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992).

3.2. Tests nutritionnels

3.2.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les résultats montrent une assimilation préférentielle des sucres selon nos isolats et souche de référence. Le Mannitol, Glucose, Lactose et Fructose sont bien assimilés par les souches. Cependant le Maltose est utilisé par nos isolats et la souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* excepté les souches BATP1AN2, BATP2AN1, BATP1N3, BATP1N4 et CTN7. De même pour le Galactose, il n'est assimilé que par trois souches : la BOTN3, CTAN3 et CTAN4.

Selon Vincent (1970), Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) les rhizobia présentent un large spectre d'assimilation vis-à-vis des hydrates de carbone.

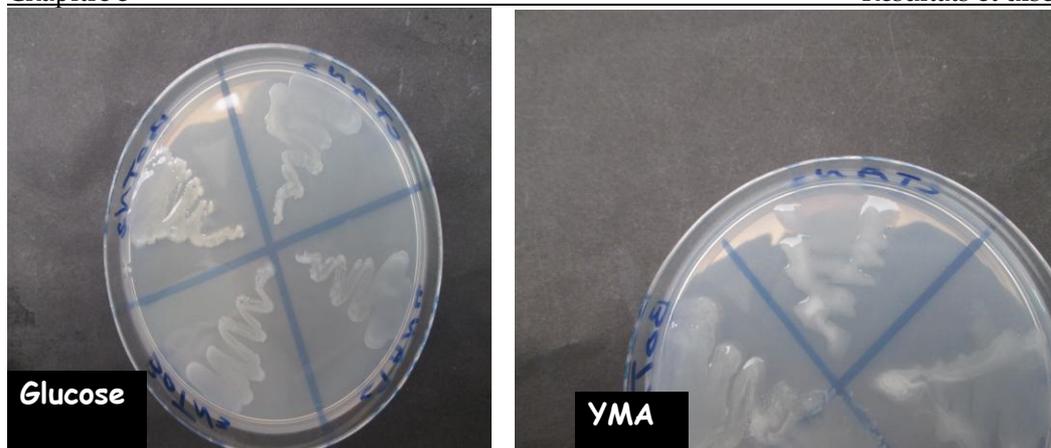
Lui et *al* (2005), ont constaté qu'il existe des différences entre les souches de rhizobia dans leur aptitude à assimiler les différents hydrates de carbone ce qui est en parfait accord avec nos résultats.

Tableau 5 : Assimilation des substrats carbonés par les isolats et la souche de référence.

	Maltose	Mannitol	Glucose	Lactose	Galactose	Fructose
BATP1AN2	-	±	±	-	-	-
BATP2AN1	±	+++	+++	+	-	±
BATP1N3	±	+++	±	++	-	+
BATP1N4	-	+++	±	±	-	±
BATP1N5	+	++	++	++	-	+++
BOTN1	+	++	+	+++	-	++
BOTN2	±	++	++	-	-	±
BOTN3	++	++	++	++	+	++
BOTN4	++	+++	+++	+	-	+++
CTN2	+++	+	+++	+	-	++
CTAN3	+++	+++	++	++	+	++
CTAN4	+++	+++	++	++	+	++
CTN7	-	+++	+++	±	-	+
<i>R.l.bv.viciae</i>	+	+++	+++	+	-	+++

(+++) Très bonne croissance, (++) Bonne croissance, (+) Croissance moyenne, (±) Faible croissance,

(-) Absence de croissance.



Photographie 14: Croissance des isolats en présence de quelques sucres.

3.2.2. Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote

Les résultats montrent que la croissance de nos différents isolats et la souche de référence sur le milieu défini 8 est variable selon la source d'azote rajoutée (Tableau 6, photo15).

Toutes les bactéries peuvent pousser en présence de la plupart des acides aminés utilisés comme source d'azote (Tableau 6). Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) ont constaté que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les rhizobies.

Tous nos isolats ainsi que la souche de référence affichent une très bonne croissance avec le Glutamate de Na (Témoin), Valine et Cysteine suivie par une croissance un plus moindre pour Proline, Glycine, Histidine, Serine et Isoleusine.

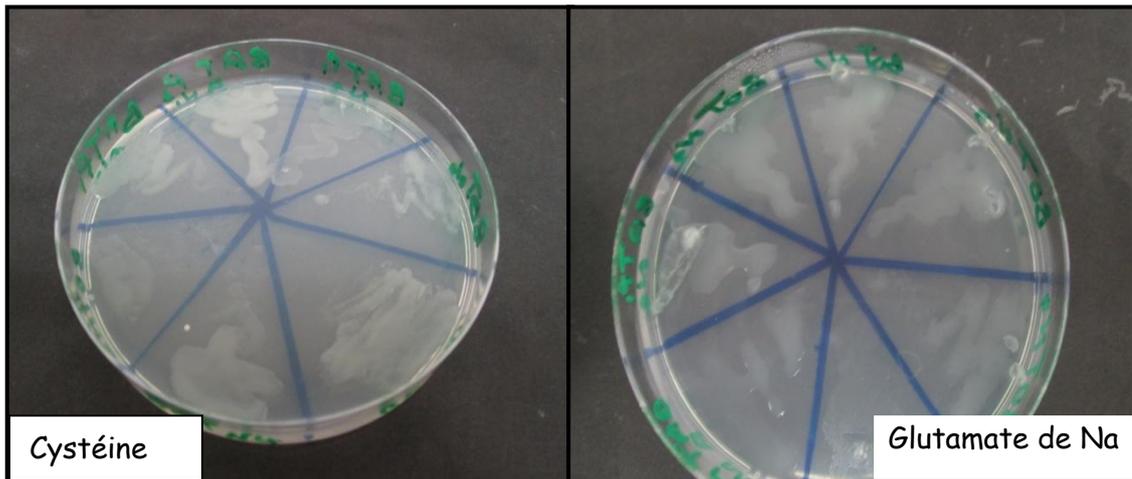
Pour les autres acides aminés comme : Leucine, Tyrosine, Arginine, Méthionine et Tryptophane on note que leur dégradation par l'ensemble de nos isolats et la souche de référence est plus au moins variable mais reste faible.

Comme conclusion on peut dire que nos isolats ont la capacité d'utiliser de divers acides aminés comme source d'azote avec une fréquence variable. Notre résultat concernant l'utilisation du Glutamate de sodium rejoint celui trouvé par Liu et *al* (2005) et Baaziz et Betchine (2013).

Tableau 6 : Utilisation des différents acides aminés par les isolats et souche témoin

Souche / Acide aminé	BOTN ₁	BOTN ₂	BOTN ₃	BOTN ₄	BATP ₁ N ₂	BATP ₁ N ₅	BATP ₂ AN ₁	CTN ₂	CTAN ₃	CTN ₇	CTAN ₄	BATP ₁ N ₄	BATP ₁ N ₃	Souche témoin
Glutamate de Na	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
Proline	++	+	+	+	++	++	++	++	+	++	+	-	++	++
Leucine	-	-	++	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	±
Histidine	-	-	+++	-	-	+++	-	++	+++	+	-	-	-	-
Tyrosine	-	+	+	-	+	++	-	±	+++	+	-	-	-	±
Glycine	-	-	+++	-	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	+++	+++
Valine	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	-	-	+++
Serine	-	±	++	-	-	++	±	-	±	±	-	-	-	±
Isoleusine	-	+	++	-	±	+++	-	-	-	±	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	±	-	++	±	±	-	-	-	±
Cystéine	+++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	+++
Méthionine	-	-	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-
Tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+++): Très bonne croissance ; (++) : Bonne croissance ; (+) : Croissance moyenne ; (±) : Faible croissance ; (-) : Absence de croissance



Photographie 15: Croissance des isolats en présence de quelques acides aminés.

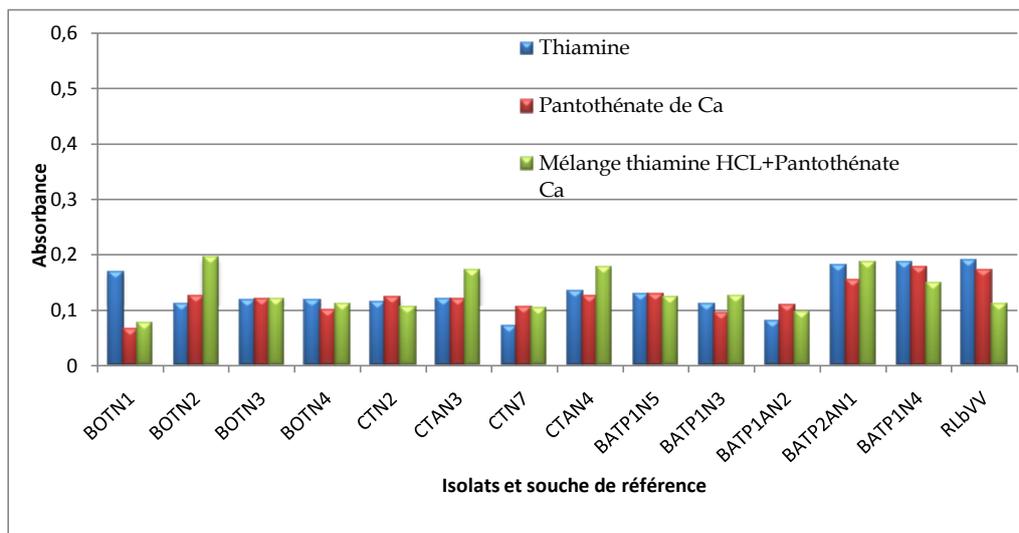
2.2.3. Besoins en vitamines

Les isolats choisis dans notre étude représentés dans la figure 7 montrent une variation de croissance en fonction des différentes vitamines testées. Pendant les 24h d'incubation on remarque une faible croissance de tous les isolats ensemencés dans le milieu BIII ainsi que la souche de référence. Alors qu'après les 48h d'incubation on observe une variabilité de croissance entre les différents isolats. La croissance de la plupart des isolats ressemble à celle de la souche de référence sauf CTN2, CTN7, BATP1AN2 et BOTN1 ont une faible croissance.

On peut dire que les vitamines testées favorisent la croissance de la majorité des isolats, on remarque que l'isolat CTAN3 possède une excellente croissance sur la Thiamine. Une bonne croissance est observée pour tous les isolats ensemencés en présence de la vitamine pantothénate de Ca. On observe également une bonne croissance pour les isolats BATP2AN1, BATP1N4, CTN4, BOTN2, CTNA3 et BOTN4 ensemencés dans le mélange thiamine HCL+ Pantothénate Ca, par contre les isolats BATP1AN2, CTN7, BOTN1 et CTN2 ensemencés dans le même mélange, ont une faible croissance.

Nos résultats concernant le développement des isolats en présence des vitamines rejoignent ceux de Werner (1992).

A



B

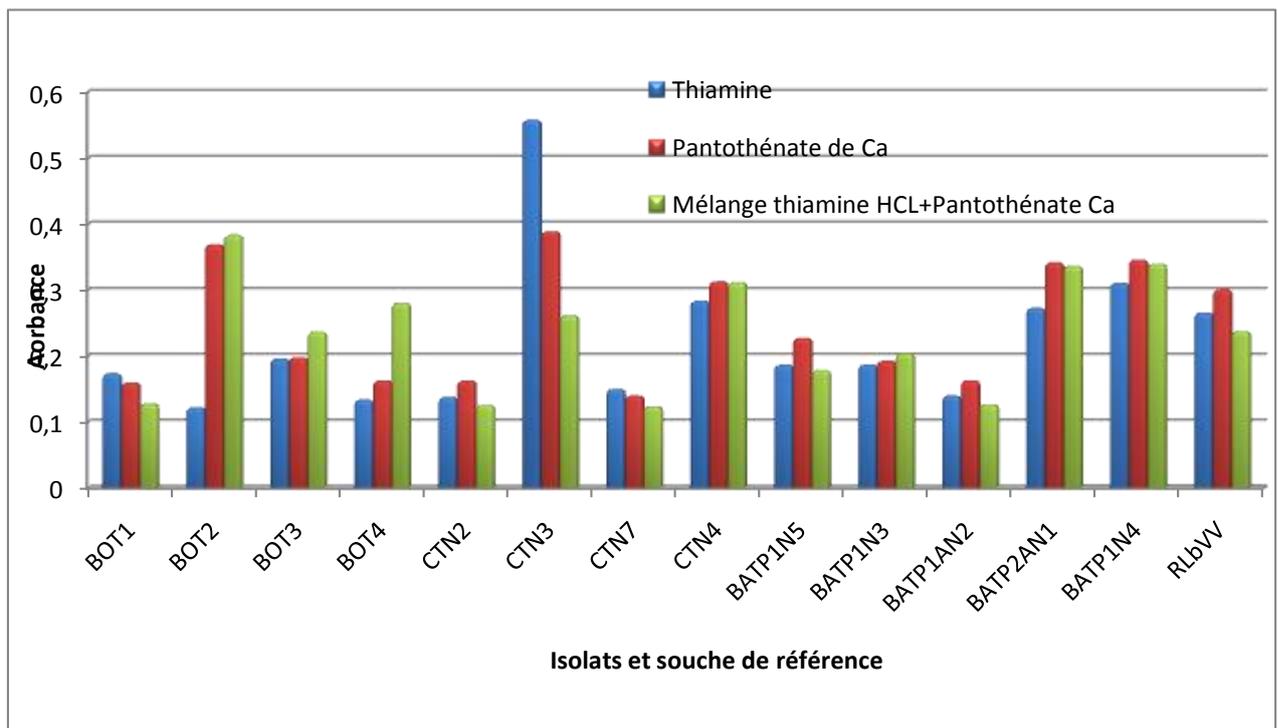


Figure 7: Utilisation des différentes vitamines par les isolats et la souche de référence

A : après 24 heures d'incubation

B : après 48 heures d'incubation

3.3. Tests physiologiques (facteurs intrinsèques)

Les divers stress biotiques et abiotique peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia à l'état saprophytique (en absence de la plante hôte). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose (Hirsh, 1996).

3.3.1. Tolérance au NaCl

La croissance des isolats et souche témoin à des concentrations de NaCl variant de 0.5% à 10% après 24h d'incubation, a été positive mais une faible croissance a été observé à 5% et 10% de NaCl. Leur tolérance varie d'une souche à une autre.

Après 48h d'incubation, la croissance diminue pour la plupart des souches telles que BATP1AN2, BATP2AN1, BATP1N3, BOTN1, BOTN2, BOTN3, CTAN4, CTN7 et *R. l. bv. viciae* à 0.5% de NaCl. A 1%, 2% et 3% la croissance diminue pour certaines souches et augmente pour d'autres.

Les rhizobiums sont généralement plus tolérants aux stress comparativement à leurs plantes hôtes (Zahran et al., 2003 ; Vriezen et al., 2006, 2007).

A 5% et 10% de NaCl la croissance diminue pour l'ensemble des souches et s'annule pour la souche de référence.

Wei et al (2008) ont noté que les souches de rhizobia nodulant les genres *Astragalus*, *Lespedeza* et *Hedysarum* sont incapables de croître à 5% de NaCl.

Tandis que des études ont montré que la tolérance au sel n'est pas corrélée avec le taux de croissance (Zerhari et al., 2000).

Ces résultats montrent que l'optimum de croissance de nos isolats est compris entre 0.5% et 3%.

Il a été montré que la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Singleton et Bahloul, 1984 ; Saadallah et al., 2001).

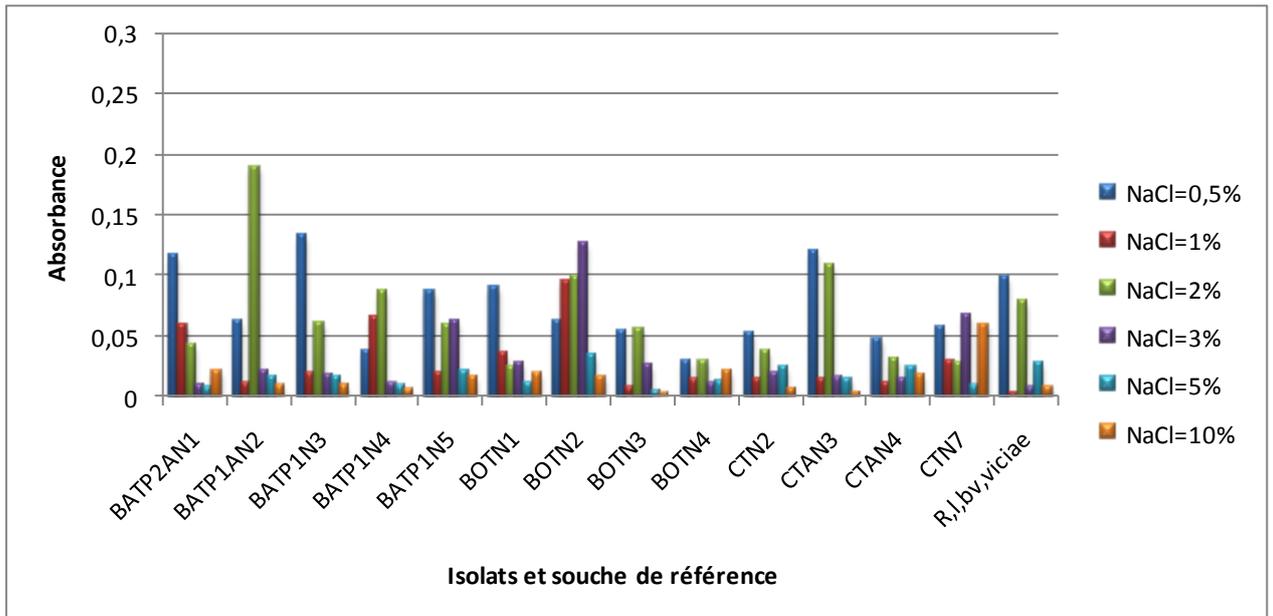


Figure 8 : Effet de NaCl après 24h d’incubation sur la croissance des souches étudiées.

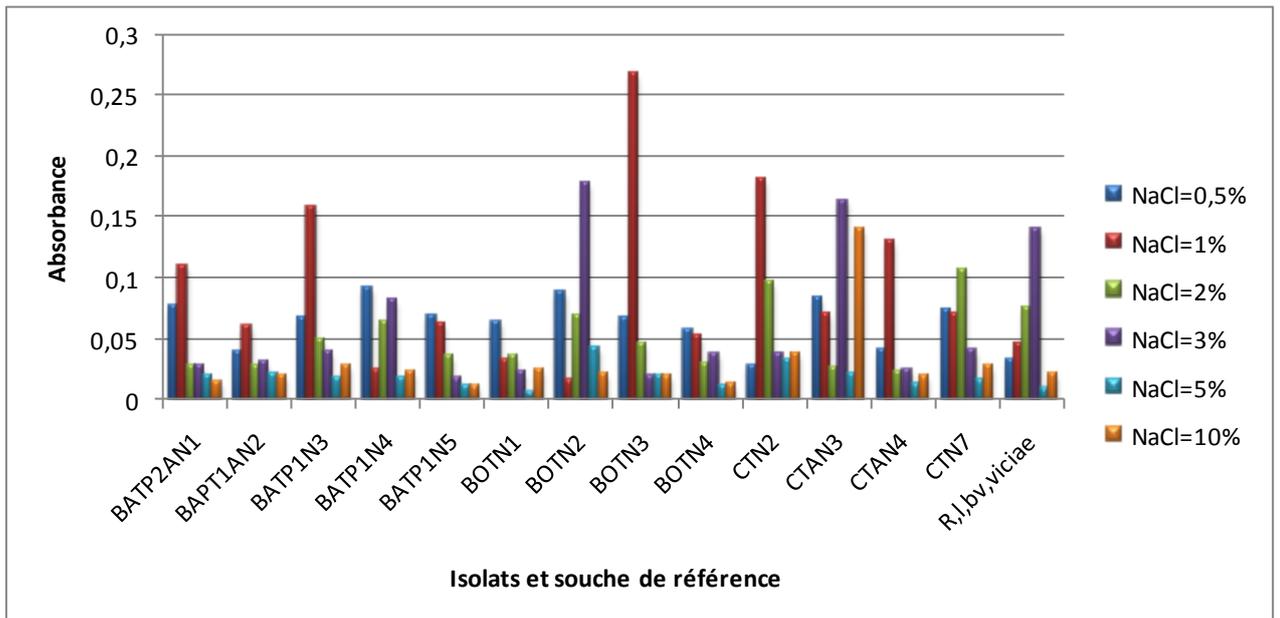


Figure 9 : Effet de NaCl après 48h d’incubation sur la croissance des souches étudiées.

3.3.2. Effet du pH

La mesure de la croissance des isolats cultivés sur le milieu YMB ajusté à des pH différents a été effectuée après 24h et 48h d'incubation.

Après 24h d'incubation (figure 10), les isolats et la souche de référence peuvent tolérer les différents pH, sauf la souche BOTN4 tolère moins le pH = 5 et 10, la BATP2AN1 a montré une faible croissance à pH 6.8 et 10. Les isolats BOTN4 et BATP1AN2 tolèrent moins le pH = 8 le même cas est observé pour la souche de référence, BATP2AN1 et BATP1N3 à pH = 10.

Après 48h d'incubation (figure 11), les souches CTAN3, BOTN4 et le témoin ont montré une faible croissance aux pH alcalins (8 et 10), ainsi que la CTN7 à pH = 8 et les BATP1N5 et BOTN1 à pH = 10.

A pH 5 toutes les bactéries sont capables de pousser. Jordan en 1984 a montré que les rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité. D'après Graham et *al* (1994) les rizobia tolérant aux pH acides sont généralement plus performantes en conditions d'acidité du sol dans le champ. Donc, la sélection des souches de rhizobium plus tolérante au faible pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité (Correa et Barneix, 1997).

D'après nos résultats, les souches étudiées ont généralement un taux de croissance rapide et sont globalement tolérantes à l'alcalinité et majoritairement tolérantes à l'acidité. Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Raza et *al* (2001) qui ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH de 4 à 10. Et sont en accord aussi avec ceux d'EL-Hilali (2006) et Gaci (2010).

L'alcalinité est moins néfaste pour la survie des rhizobiums. Jordan (1984) a montré que la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9, ce qui est le cas de nos isolats.

La croissance optimale de nos souches est comprise entre pH = 4 et 6,8.

Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de croissance des rhizobia est entre 6 et 7. Le pH optimal pour la croissance des rhizobia peut varier, en général ce sont des bactéries neutrophiles (EL-Hilali, 2006).

Les travaux de Chabbi (2010) ont montré que la majorité des souches sont capables de pousser entre pH 4 et 10, avec un optimum de croissance se situant entre pH 6,5 et 7,5.

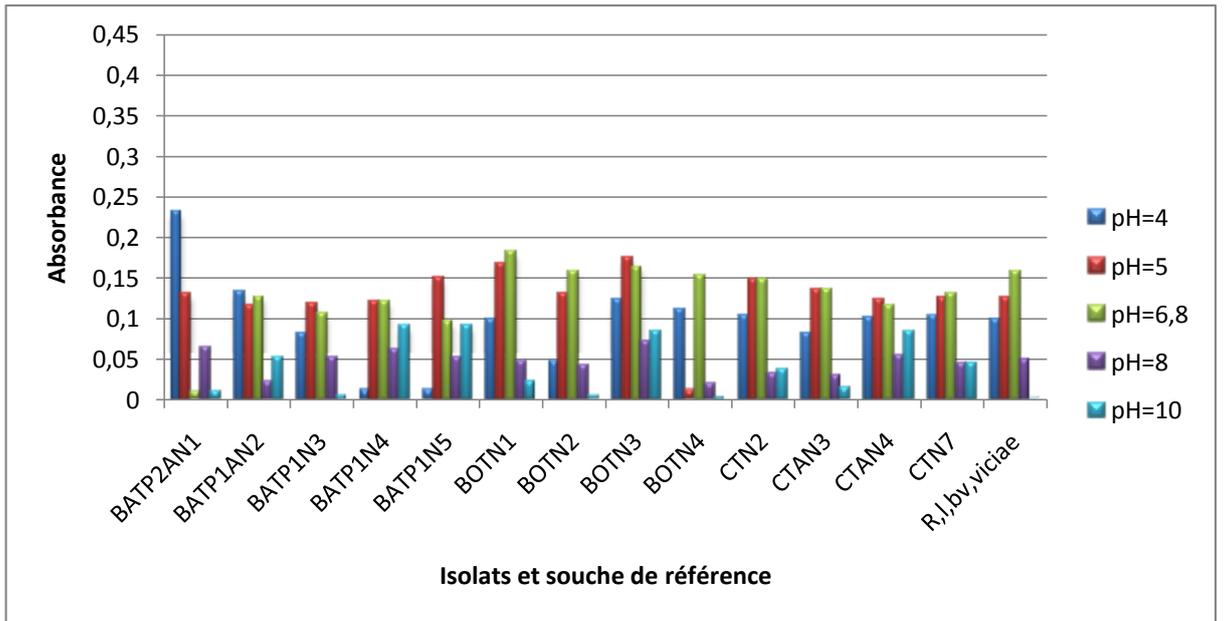


Figure 10 : Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 24h d’incubation.

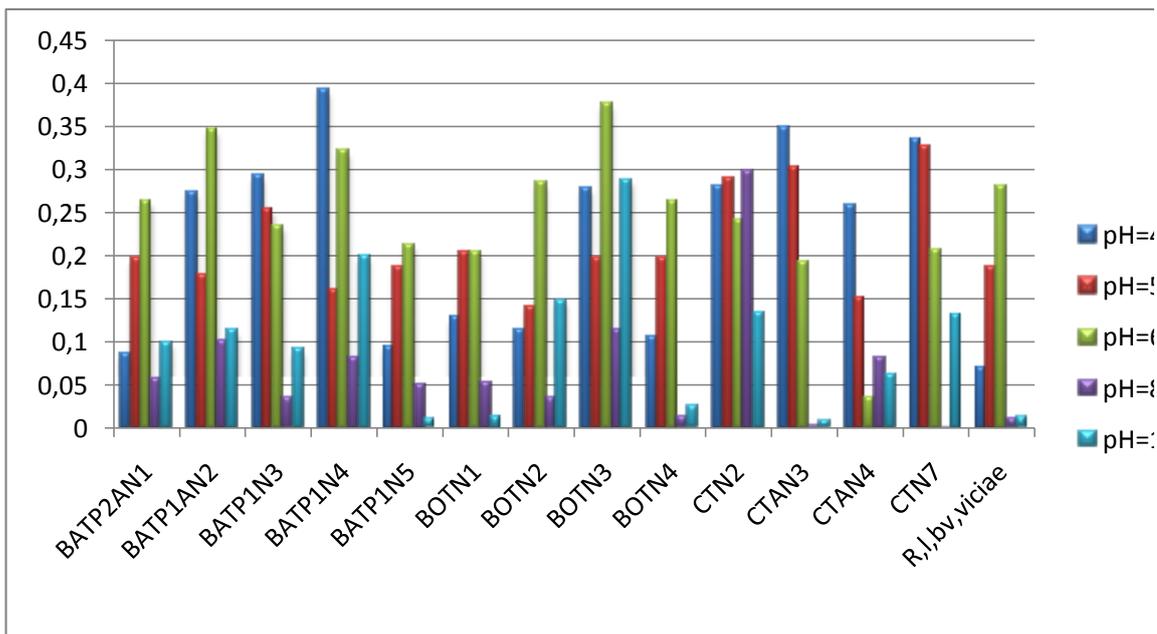


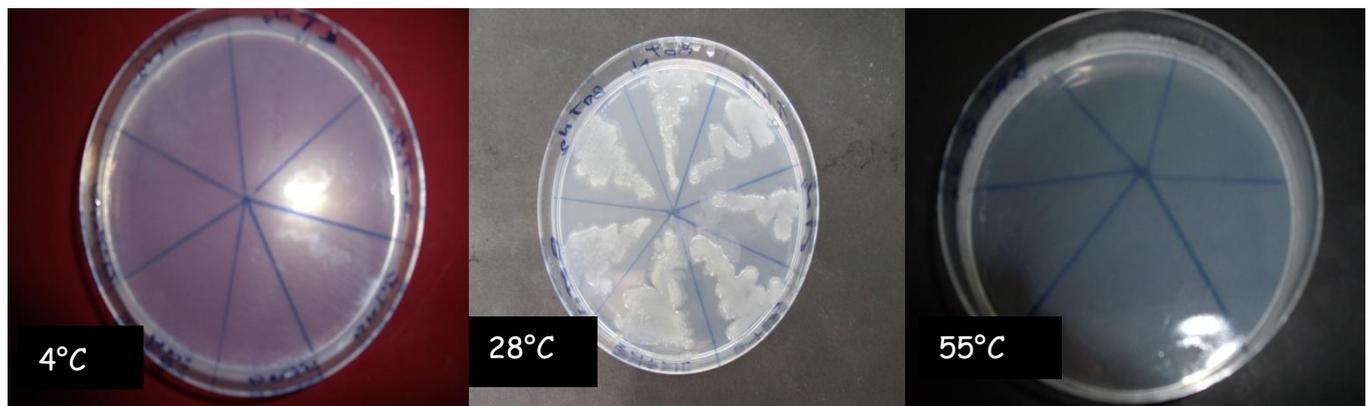
Figure 11: Tolérance des isolats et souche de référence à différents pH après 48h.

3.3.3. Effet de la température

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YMA, les résultats montrent que la plupart de nos isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 28°C jusqu'à 44°C avec un optimum de croissance entre 28 et 37°C (Tableau 7, photo 16).

La température optimale de croissance des rhizobia varie entre 28°C à 30°C (Nour et *al.*, 1994). Graham (1992) a rapporté que pour la plupart des rhizobia, la température optimale pour la croissance dans des milieux de culture est située entre 28°C et 31°C.

Aucune croissance n'est observée à 4°C (basse température) et à 55°C (haute température) (photo 16). L'exposition à des températures élevées peut mener à la réduction du nombre de cellules des bactéries au dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation. Par contre l'exposition aux hautes températures peut mener à la perte du plasmide symbiotique et par conséquent la perte de la capacité infective de la bactérie.



Photographie 16 : Croissance des isolats à quelques températures

Tableau 7 : Croissance des isolats et la souche témoin à différentes températures.

	4°C	28°C	37°C	44°C	55°C
BOTN1	-	+++	++	-	-
BOTN2	-	+++	++	+	-
BOTN3	-	+++	++	±	-
BOTN4	-	+++	++	+	-
BATP2AN1	-	+++	++	±	-
BATP1AN2	-	+++	++	-	-
BATP1N3	-	+++	++	-	-
BATP1N4	-	+++	++	±	-
BATP1N5	-	+++	+	±	-
CTN2	-	+++	++	+	-
CTAN3	-	+++	++	±	-
CTN4	-	+++	++	±	-
CTN7	-	+++	++	±	-
<i>R.l.bv. viciae</i>	-	+++	++	±	-

(+++): Bonne croissance ; (++) : Croissance moyenne ; (+) : Faible croissance ; (-) : Pas de croissance

3.4. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

L'application de l'électrophorèse selon Laemmli (1970) modifié nous a permis d'interpréter les profils protéiques des isolats et souche de référence. La présence ou l'absence des bandes protéiques pour chaque bactérie est déterminée par une comparaison visuelle des profils électrophorétiques (Tableau 7).

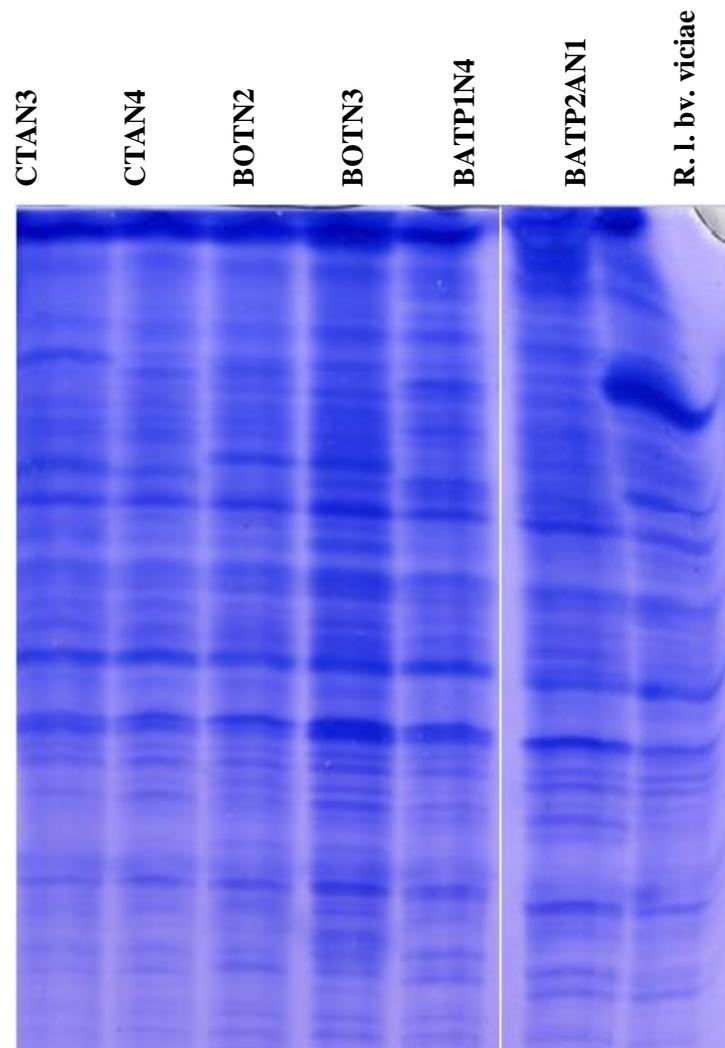


Figure12 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrilamide des protéines totales.

Tableau 8 : Présence et absence des bandes protéiques.

Souche Bandes	CTN3	CTAN4	BOTN2	BOTN3	BATP1N4	BATP2AN1	<i>R. l. bv. viciae</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	0	1
3	0	0	0	0	0	0	1
4	1	1	0	1	1	1	0
5	1	0	0	0	0	1	0
6	0	1	1	1	0	1	0
7	0	0	1	1	1	1	1
8	0	0	0	0	1	1	1
9	1	0	1	1	0	1	1
10	1	1	0	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	0
12	1	0	0	1	0	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	0	0	0	0	0
15	1	1	0	1	0	0	0
16	0	0	0	1	1	1	0
17	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1
19	0	0	0	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1
21	0	0	0	1	1	0	0
22	1	1	0	1	1	1	0
23	0	0	1	1	0	0	0
24	1	1	1	1	1	1	1
25	0	1	0	1	0	0	0
26	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1
28	0	0	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	1
30	0	0	0	1	0	0	1
31	0	0	0	1	0	0	1
32	1	1	1	1	1	1	1

1 signifie la présence de la bande protéique. **0** signifie l'absence de la bande protéique.

La ressemblance entre les profils électrophorétique de chaque paire de souche bactérienne est déterminée par le calcul du coefficient de similitude selon la formule ci-dessous :

$$\text{Coefficient de similitude} = \frac{\text{Le nombre des bandes communes entre les 2 souches} \times 100}{\text{Le nombre total des bandes}}$$

Le coefficient d'association est arrangé en une matrice de similitude qui compare chacune des bactéries à toutes les autres.

Tableau 9 : Matrice de similitude des profils protéiques.

Souches	CTAN3	CTAN4	BOTN2	BOTN3	BATP1N4	BATP2AN1	<i>R.l.bv.viciae</i>
CTAN3	100	87,5	62,5	59,4	68,75	81,87	53,12
CTAN4		100	68,75	65,62	68,75	56,25	46,87
BOTN2			100	65,62	62,5	65,62	68,75
BOTN3				100	81,87	68,75	65,62
BATP1N4					100	81,25	68,75
BATP2AN1						100	68,75
BATP2AN1							100

Le dendrogramme obtenu après analyse numérique par le logiciel XLSTAT 2014 des électrophorégrammes a permis de distinguer trois groupes électrophorétiques (figure 13).

La classification de nos isolats montre le **Clade 1** regroupe la souche de référence et l'isolat BOTN2, **clade 2** regroupe les souches BATP2AN1, BAPT1N4 et BOTN3 et **clade 3** regroupe les deux souches CTAN3 et CTAN4.

Le pourcentage de similitude le plus élevé, entre les deux souches BATP2AN1 et BAPT1N4 qui correspond à 81,25%.

Ce résultat est en accord avec celui de Ndiaye et al (2002) ; wang et al et Gaci (2010) et

qui ont montré qu'il existe une grande diversité parmi les souches isolées des nodules d'une même légumineuse.

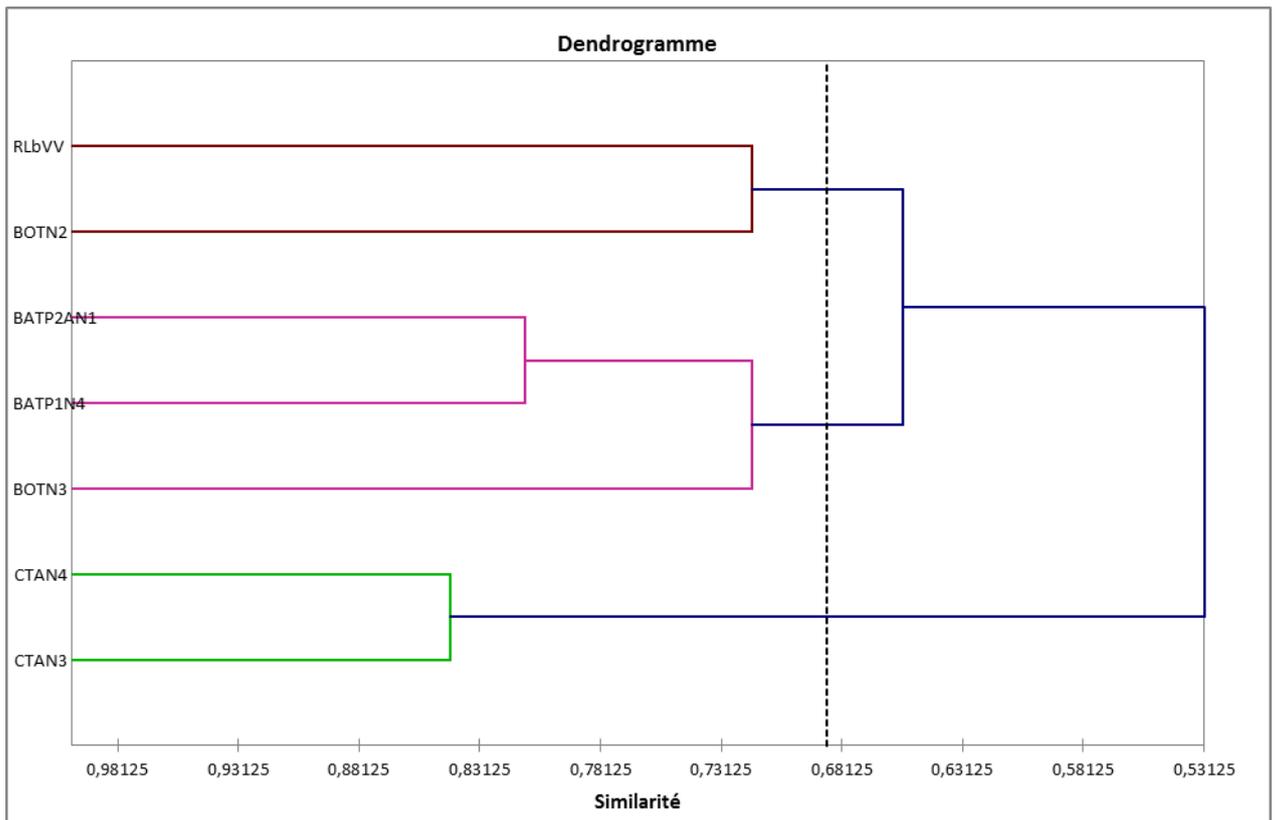


Figure 13: Dendrogramme montrant les relations entre nos isolats et la souche de référence.

Conclusion générale

Dans ce travail nous avons procédé à un isolement et une caractérisation, des bactéries nodulant le pois fourrager (*Psium sativum* L.) cultivé dans trois régions différentes, continentale, semi-aride et littorale de l'Est et Centre Algérien.

L'ensemble des résultats obtenus concernant l'étude morphologique et culturale, ainsi que l'examen microscopique, ont montré que l'ensemble des isolats présentent des caractères du genre *Rhizobium*.

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

Tous les isolats peuvent nodulé les racines de la plante hôte sous des conditions bactériologiquement contrôlées, ce résultat confirme que nos bactéries sont les microsymbionts du pois fourrager.

Les résultats des tests nutritionnels montrent une assimilation préférentielle des sucres selon nos isolats et souche de référence. Le Mannitol, Glucose, Lactose et Fructose sont bien assimilés par les souches. Toutes les bactéries peuvent pousser en présence de la plupart des acides aminés utilisés. On constate que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les rhisobia. Les résultats de l'utilisation des vitamines montrent qu'elles favorisent la croissance de la majorité des isolats.

Nous avons évalué la tolérance de tous les isolats vis-à-vis les principaux facteurs de stress tels que le pH, NaCl et la température. Les isolats et la souche de référence peuvent tolérer les différents pH allant de 4 à 10 sauf la souche BOTN2 tolère moins le pH = 4 et 10. Ainsi que les isolats BOTN4 et BATPIAN2 tolèrent moins le pH = 8. Quant à la température, la tolérance totale s'étend jusqu'à 44°C. La tolérance au sel est très importante pouvant aller jusqu'à 3%.

La recherche des enzymes spécifiques nécessaires pour la croissance des BNL dans le sol tel que la nitrate réductase, l'uréase, et l'enzyme nécessaire pour la relation symbiotique (cellulase), démontre que nos isolats sont pourvus de ces trois enzymes.

La technique d'électrophorèse a été réalisée pour comparer les protéines totales des différents isolats. L'application de cette technique nous a fourni un diagramme, et nous avons trouvé que les souches isolées à partir des nodules présentent un polymorphisme du profil protéique par SDS-PAGE, il existe une ressemblance entre l'isolat BOTN2 et la souche témoin *Rhizobium leguminosarum bv viciae*, ainsi que les deux isolats CTAN3 et CTAN4. Et une diversité entre les souches BATP2AN1, BAPT1N4 et BOTN3.

Références bibliographiques

Allen O.N et Allen E.K., 1950. Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. *Bacterial. Rev.* 14 : 273-330.

Anonyme., 2014. La plante du pois fourragé *Pisum sativum* L.

Baaziz H et Betchine K., 2013. Isolement et Caractérisation phénotypique des bactéries, Nodulant la légumineuse *Pisum sativum* L., isolées après piégeage et sans piégeage du sol de la plante. 101p.

Beck D.P, Materon L.A et Afandi F., 1993. Pratical Rhizobium – legume technology manual,. ICARDA(Ed), Syria,. p389.

Becker A, Berges H, Krol E, Bruand C, Ruberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, Bruijn F.J, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Kuster H, Liebe C, Puhler A, Weidner S et Batut J., 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 292-303.

Benguedouar A., 2000. Etude de la symbiose *Rhizobium-Hedysarum coronarium*:essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium* «Hedysari». Thèse de doctorat de l'université de constantine. Algérie.

Bladergroen M.R et Spaink H.P., 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminoseae symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(4): 353-359.

Brink M et Belay M.G., 2006. Céréales et légumes secs. PROTA. Wageningen Pays-Bas. 327p. p171- 175.

Chabbi R., 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. poussant dans différents écosystème de L'Est algérien. Mémoire de Magister : Biotechnologie Végétale. Université Mentouri Constantine.

Chen J. L, Lin S et Lin L. P., 2006. Rhizobial surface biopolymers and their interaction with lectin measured by atomic force microscopy. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 565- 570.

Chen, Wen-Ming, James, Euan K, Coenye, Tom, Chou, Jui-Hsing, Barrios, Edmundo, de Faria, Sergio M, Elliott, Geoffrey N, Sheu, Shih-Yi, Sprent, Janet I, Vandamme et

Peter., 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56: 1847-1851.

Chen W.M, de Faria S.M, Chou J.H, James E.K, Elliott G.N, Sprent J.I, Bontemps C, Young J.P et Vandamme P., 2008. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(9):2174-9.

Christine Finnie, Angeles Zorreguieta, Nigel M. Hartley, et J.Allan Downie., 1998. Characterization of *Rhizobium leguminosarum* Exopolysaccharide Glycanases That Are Secreted via a Type I Exporter and Have a Novel Heptapeptide Repeat Motif, *Journal of Bacteriology*, Vol. 180, No. 7, p. 1691-1699.

Corbière H.L.F., 2002. The importance of sucrose synthase for AM symbiosis in maize, in pea and in Medicago . Thèse de doctorat Andriankaja, 200 p.

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

Cousin R., 1992. Les oleo-protéagineux .In: *Gallais.A et Bannerot.H. Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection.* Edition INRA. France : Quae. ISBN 978-2-7380-03383-6.

Coyne V.E.M.J. Diane; S.J.Reid; E.P. Rybicki., 2002. *Molecular Biology Techniques Manual : SDS POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS PAGE).* University of Cape Town. Dept Microbiology.

Crutzen., 2007. Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nat. Rev. Genet.* 2: 607-619.

Dardanelli M, Angelini J et Fabra A., 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Canadian journal of microbiology* 49: 399-405.

Delarras C., 2007. Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne. In *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.* TEC & DOC, EM inter;pp126-172.ISBN.:978-2-7430-0945-8.

Denarié Prome J.C et Broughton W.J., 1992. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* 6: 3575-3584.

Deryfus B, Garcia J.L et Gillis M., 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* *gen. Nov., sp.*, a stem- nodulating nitrogen- fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int .J. Syst. Bcteriol.* 38 :89-98.

Djordjevic, M.A., 2004. « *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. » *Proteomics* 4(7): 1859-1872.

El Hilali I., 2006. La Symbiose Rhizobium-Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez *Lupinus- luteus*. Thèse de Doctorat : Microbiologie et Biologie moléculaire. Université Mohamed V-AGDAL.Rabat.189p.

Esseling J.J, Lhuissier F.G.P et Emons A.M.C., 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988.

Euzéby J.P., 2007. Abrégé de bactériologie générale et Médicale à l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse (En ligne) Disponible sur « [hpp://www.bacteriologie.net](http://www.bacteriologie.net) »

FAO (1996) Tunisie : Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur le ressources phytogénétiques, Ministère De L'Agriculture Tunis.

Faraheus A, Thami-Alami I, Udupa S.M., 2010. Phenotypic and genetic diversity in *sinorhizobium meliloti* and *S.medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology* 10:15.

Figueiredo M.V.B, Martinez C.R, Burity H.A et Chanway C.P., 2008 b. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187-1193.

Foucher F et Kondorosi E., 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43:773-786.

Frank B., 1889. Uber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. Bot. Zeitung. 24 pp 377-388.

Gaci M., 2010. Isolement et caractérisation des bactéries autochtones, nodulant les légumineuses, piégées à partir de l'habitat naturel de la légumineuse *Pisum sativum* L. Mémoire de Magister : Microbiologie option Ecologie Microbienne. Université Mentouri., Constantine. Algérie. 103p.

Gage D et Margolin W., 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology* 3(6): 613.

Gage D.J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2): 280-300.

Gepts P, Beavis W.D, Brummer E.C, Shoemaker R.C, Stalker H.T, Weeden N.F, Young N.D., 2005. Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228—1235.

Geurts R, Fedorova E et Bisseling T., 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8: 346-352.

Graham P.H., 1992. Stress tolerance *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can, J. microbial.*38 : 484.

Graham P. H et Vance C P., 2003. Legumes : Importance and constraints to Greater Use. *Plant Physiol.* 131: 872-877.

Guignard J.L et Dupont F., 2005. Botanique. 13ème Edition Masson.Sprent : 164-179.

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

Hirsch P. R., 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.*, 133: 159-171.

Hopkins W.G., 2003. – Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. P 99 – 120.

- Jarvis B.D.W., Mc Ieam T. S, Robertson I.G.C et Fanning G.R., 1977.** Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and Rhizobium strains from agricultural plants. *New Zealand J.Agric. Res.* 20, 42-52.
- Javis B.D.W, Pankhurst C.E et Patel J.J., 1997.** Rhizobium lotia new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 :378-380.
- Joffin J.N et Leyval G., 2006 :** Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4^e édition de Scrérén CRDP. Aquitaine, Espagne.
- Jordan D.C., 1982.** Transfer of rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J. Syst.Bacteriol.* 32 : 136-139.
- Jordan D.C., 1984.** Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1 the Williams & Wlikins Co. Baltimore., p234-256.
- Journant E.P., 2004.** Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. www.crdp-toulouse.fr.
- Judd W.S, Campbell C.S, Jules Bouharmont, Kellogg E.A et Stevens P., 2001.** Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.
- Laemmli U.K., 1970 .** Cleavage of structural proteins during the qussembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* N°227 pp 680-685.
- Limpens E et Bisseling T., 2003.** Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 343-350.
- Lin, Dong Xu, Wang, En Tao, Tang, Hui, Han, Tian Xu, He, Yu Rong, Guan, Su Hua, Chen, Wen Xin., 2008.** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008 58: 1409-1413.
- Lindström K, Terefework Z, Suominen L et Lortet G., 2002.** Signalling and development of Rhizobium-legume symbiosis. biology and environment: *Royal I rish Academy* 102 (1): 61-64.

- Liu J, Wang E.T et Chen W.X., 2005 .** Diverse Rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis.*, *Cercis racemosa*, and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:465-477.
- Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G et Gresshoff P.M., 2009.** Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104: 277-285.
- Lucinski R, Polcyn W et Rotayczak L., 2002.** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimia Polonia.* 49 (2): 537-546.
- Madigan M et Martink J., 2007.** Brock Biologie des microorganismes 11^e édition. Edition Person Education France. Pp 599-601, 676-681.
- Mateos P.F, Jiménez Zurdo J.I, chen J, Squartini A.S, HaaCK S.K, Martinez-Molina E, Hubbell D.H et Dazzo F.B., 1992.** Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Appl Environ Microbiol.* 58(6):1816-1822.
- Michelle I et Lindeque., 2006.** Diversity of root nodule bacteria associated with *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* species in south Africa. University of Protoria.
- Mobley I.T.H., 1992.** Urease Microbial.J Lederberg (ed). Encyclopedia of microbiology. 4:327-346.
- Moulin, L, Munve A, Dreyfus B et Boivin-Masson C., 2001.** Nodulation of legumes by members of B subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411: 948-950.
- Mulder L, Hogg B, Bersoult A, Cullimore J.V., 2005.** Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiol. Plant* 123: 207-218.
- Ndiaye A.A, Sylla S.N, Gueye M, Delajudie P et Ndoye I., 2002.** Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide -SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des *Rhizobiums* d'*Acacia tortilis* (Forsk) Hayne subsp *.Raddiana*(Savi) brenan. African Jornal of Science and Technology. *Science and Engineering Series.* 3(1):33-43.

Nour S.M, Fernandez M.P, Normand P et Cleyet-Marel J. C., 1994. Rhizobium ciceri sp. Nov., consisting of strains that nodulate chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 511-522.

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

Patriarca E.J, Tate R, Ferraioli S et Iaccarino M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* 234: 201-62.

Pelmont J., 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541-572.

Perry J.J, Stalex J.T et Lory S., 2004. Microbiologie cours et questions de revision. Edition Dunod. Paris. France.

Quezel P et Santa S., 1962. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, volume 1, p523.

Ramirez-Bahena, Martha Helena, Garcia-Fraile, Paula, Peix, Alvaro, Valverde, Angel, Rivas, Raul, Igual, Jose M, Mateos, Pedro F, Martinez-Molin, Eustoquio, Velazquez et Encarna., 2008. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum*.

Rasanen L., 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland Oldroyd. 220p.

Raven P.H, Evert R.F et Eichlorn S.E., 2000. Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.

Riah N., 2001 . Etude de la symbiose Rhizobium -pois fourrager (*Pisum arvensis* L).Essais de production d'inoculum et inoculation au champ .Thèse de magister : Biochimie et Microbiologie Appliquée .Université Mentouri Constantine. 124p.

Rivas R, Willems A, Subba-Rao N.S, Mateos P.F, Dazzo F.B, Kroppenstedt R.M, Martinez-Molina E, Gillis M, Velazquez E., 2003. Description of *Devosi aneptuniae* sp. Nov.that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with Neptunianatans, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbial.* 26:47-53.

Simms E.L et Taylor D.L., 2002. Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes, and Rhizobia1. *Comp. Biol.* 42: 369-380.

Smil V., 2002. Biofixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. In : *Nitrogen fixation: global perspectives*. T.M. Brogan *et al.* ed., CAB International, New York, 7-9.

Somasegaran P et Hoben H.J., 1994. Handbook for rhizobia: methods in legumes-Rhizobium Technology. Springer verlag. ISBN:0-387-94134-7.

Spaink H.P, Wijffelman C.A, Pees E, Okker R.J.H et Lugtenger B.J.J., 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature*. 328 : 337- 340.

Struffi P, Corich V, Giacomini A, Benguedouar A, Squartini A, Casella S et Nuti M.P., 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl Microbiol.* 84(1) pp81-89 supporting bacteria Current Science, vol. 89,N°1.

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

Uved.,2005. Cycledel'azote. Disponible sur

http://www.cima.ualg.pt/piloto/UVED_Geochimie/UVED/projet/2/site/html/2/2-5/2-5-3/2-5-3-3.html. Consulté le 21.4.2014.

Vandamme, Wang, Feng Qin, Wchen, Wen-Ming, de Faria, Sergio M, James, Euan K, Elliott, Geoffrey N, Lin, Kuan-Yin, Chou, Jui-Hsing, Sheu, Shih-Yi, Cnockaert M, Sprent, Janet I, Peter., 2007. *Burkholderia nodosa* sp. Nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbial.* 57: 1055-1059.

Vincent J.M., 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP handbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England.

- Vriezen J.A.C, De Bruijn F.J et Nusslein K., 2006.** Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Lett. Appl. Microbiol.* 42 :172-178.
- Vriezen J.A.C., De Bruijn F.J., et Nusslein K., 2007.** Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 :3451-3459.
- Wang F.Q, Wang E.T, Zhang Y.F et Chen W.X., 2006.** Characterisation of rhizobia isolated from *albizia* spp. In comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. And *Leucaena leucocephala* grown in China. *Syst.Appl. Microbiol.* 29 : 502-517.
- Wei G.H, Zhang Z.X, Chen C, Chen W.M et Ju W.T., 2008.** Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. *Microbiol research.* 163 : 651-662.
- Weir B.S., 2012.** The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Disponible sur <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>: Consulté le 08 juin 2014.
- Werner D., 1992.** Symbiosis of plants and microbes. Edition Chapman & Hall. Germany.
- Williames P.E.V, Innes G .M et Brewer A., 1984.** Ammonia treatment of straw via the hydrolysis of urea. I Effects of dry matter and urea concentrations on the oraf they droyusis of urea. *Anim. Feed Sci. Technol.*1:103-113.
- Yomeogo-Bougouma V, Cordesse R, Arnaud A et Inesta M., 1993.** Identification de l'origine des uréases impliquées dans le traitement de la paille de blé dur à l'urée et caractérisation de la flore microbienne présente. *Ann ; Zootech.* 42:39-47.
- Yong J.P.W, Demetriou L et Apte R.G., 2003.** *Rhizobium* population genetic : enzymes polymorphisme in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in a pea corp. *Inter J. appl. Environ. Microbial.* 53:397-402.
- Zahran H, Abdel-Fattah M, Ahmad M.S et Zaki A.Y., 2003.** Polyphasic taxonomy of symbiotic rhizobia from wild leguminous plants growing in Egypt. *Folia Microbial.* 48:510-520.

Zerhari K, Aurag J, Khbaya B, Khrchaf D et Filali-Malouf A., 2000. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 351-347.

Zuanazzi J.A.S, Clergeot P.H, Quirion J.-C, Husson H. P, Kondorosi A et Ratet P., 1998. Production of *Sinorhizobium meliloti nod* gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:784-794.

Zurdo-Pineiro, Jose Luis, Rivas, Raul, Trujillo, Martha E, Vizcaino, Nieves, Carrasco, Jose Antonio, Chamber, Manuel, Palomares, Antonio, Mateos, Pedro F, Martinez-Molina, Eustoquio, Velazquez et Encarna., 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 784-788.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

La Composition de milieux YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent,1970)

Mannitol.....	10
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,2
NaCl.....	0,1
Extrait de levure.....	0,5
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

La Composition de milieux YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB.....	1000ml
Agar.....	18
Ph.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

La Composition de milieux YMA+Rouge Congo en g/l

YMB.....	1000ml
Solution stock de rouge Congo ¹	10ml

Agar.....	18
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de ph on ajoute 10ml de rouge Congo (0,25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

La Composition de milieux YMA+BTB (Vincent, 1970)

YMA.....	990ml
solution stock de BTB ²	10ml
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Solutions stoks colorants

¹ Solution stock de RC : 0,25g de rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.

²Solution Stock de BTB : 0,5g de BTB dissous dans 100ml d'éthanol.

La composition de milieu GPA+BCP (Vincent, 1970)

Glucose.....	5
Peptone.....	10
Solution stock de BCP.....	10ml
Agar.....	15
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La composition de milieu TYA en g/l d'eau distillée

Trypton	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O.....	0,87
Agar.....	15
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

La composition de la solution nutritive en g/l (Fahreus, 1957)

CaCl ₂	0,1
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,12
KH ₂ PO ₄	0,1
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O.....	0,15
Citrate de fer.....	0,01
Micro-éléments	1ml

Solution de micro-éléments (g/l)

H ₃ BO ₃ H.....	2,86
MnSO ₄ 4H ₂ O.....	2,03

ZnSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,22
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O.....	0,14
CuSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,08
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La composition de milieu : BIII (Dazzo,1982)

La composition chimique de ce milieu de culture en g/l d'eau distillée est :

K ₂ HPO ₄	0,23
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,1
Glutamat de Na.....	1,1
Solution – stock de vitamine ³	1ml
Solution -stock d'oligoéléments ⁴	1ml

³Solution -stock de vitamines (mg /l)

Riboflavine.....	20
Acide para-amino-benzoïque.....	20
Acide nicotinique.....	20
Biotine.....	20
Tiamine-HCl.....	20

Pyridoxin-HCl.....	20
Panhotenate de Ca.....	20
Inositol.....	120
Dissoudre dans un tampon Na ₂ HPO ₄ ,0,05M.....	1000ml
pH.....	7
Cette solution est stérilisée par filtration.....	0,22µm

⁴Slution -stock d'oligoéléments (g/l)

CaCl ₂	5
H ₃ BO ₃	0,145
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0,13
CoSO ₄ 7H ₂ O.....	0,07
CuSO ₄ 5H ₂ O.....	0,01
MnCl ₂ 4H ₂ O.....	0
ZnSO ₂ 7H ₂ O.....	0,11
Na ₂ MoO ₄	0,125
Nitril triacétate.....	1

Ce dernier n'est ajouté qu'après avoir ajusté le pH à 5,0, évitant ainsi une précipitation.

La composition de milieu Défini 8 (Vincent, 1970)

La composition chimique de ce milieu de culture en g/l d'eau distillée est:

K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄	0,21
Glutamate de Na.....	1
Na ₂ HPO ₄	0,3
CaCl ₂	0,2
Mannitol.....	1
Solution -stock de vitamines ⁵	1ml
Solution -stock d'oligoéléments ⁶	1ml
pH.....	6,8

Autoclave à 120°C Pendant 20 Minutes

⁵Solution -stock de vitamines (mg/l de tampon)

Acide Nicotinique.....	100
Thiamine.....	100
Panthotenate de Ca.....	100
Dissoudre dans un tampon Na ₂ HPO ₄ 0,05M.....	1000ml
pH.....	7
Cette solution est stérilisée par filtration.....	=0,22µm

⁶Solution- stock d'oligoéléments (mg/l d'eau distillée)

H ₃ BO ₃	50
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	35
CuSO ₄ 5H ₂ O.....	8
MnCl ₂ 4H ₂ O.....	40
ZnSO ₄ 7H ₂ O.....	16
pH	6,9

La solution -stock d'oligoélément est ajoutée et stérilisée avec le milieu

La composition de milieu lactate-aspartate de sodium

(Gloux et Le Rudelier, 1989).

Solution A (g/l)

KH ₂ PO ₄	0,3
NaHPO ₄	0,3
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,1
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	0,05
Eau distillée.....	1000ml

Solution B (mg/l)

H ₃ BO ₄	10
ZnSO ₄	1

CuSO ₄	1
MnCl ₂ 4H ₂ O.....	0,5
FeCl ₃ 6H ₂ O.....	0,1
Eau distillée.....	1000ml
Et aussi	
Biotine.....	20 µg
Acide aspartique.....	100 mg
Acide lactique.....	0,74 g

Préparation du milieu

Prendre 100 ml de la solution A

Mélanger avec 20 ml de la solution B ensuite compléter le volume à 1000 ml

Additionner l'acide lactique et l'acide aspartique

Ajuster le pH à 7

Autoclavage à 120 °C pendant 20 min

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu

On ajoute dans chaque cas la concentration sélectionnée de NaCl.

Les réactifs de la nitrate réductase

Réactif 1: Acide sulfanilique à 3% préparé dans l'acide acétique 5M

Réactif 2: l' alpha naphthylamine à 0,5% préparé aussi dans l'acide acétique 5M

Annexe 2

La coloration de Gram

On prépare des lames bien étalées en couches mince, séchées et fixées. Puis elles sont colorées selon les étapes suivantes :

2. Déposer une goutte d'eau distillée stérile au centre d'une lame propre.
3. Prélever une petite quantité d'une colonie à l'aide d'une anse de platine
4. mélanger avec la goutte d'eau, sécher par passage sur la flamme d'un bec benzène.
5. Couvrir la lame de violet Gentiane pendant une minute.
6. Éliminer l'excès du violet de Gentiane avec du Lugol et ensuite couvrir la lame avec le Lugo pendant 30 secondes.
7. Décolorer au mélange Alcool-Acétone jusqu'à la décoloration totale du frottis en maintenant la lame en position inclinée.
8. Laver à l'eau de robinet.
9. Couvrir la lame d'une solution de Fuchsine pendant 1minute.
10. Laver à l'eau, sécher la lame avec du papier absorbant.
11. Déposer une goutte d'huile de Paraffine ou de vaseline stérile sur le frottis, et observer au microscope (objectif à immersion X100).