



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie Microbienne

Évaluation de l'efficacité symbiotique de quatre souches de
Rhizobium leguminosarum sv. *viciae* nodulant le pois *Pisum*
sativum.

Présenté et soutenu par :

BENANTAR Fatma Zohra

AYOUNI Rym

Le : 17/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr BENGUEDOUAR Ammar

Professeur - UFM Constantine.

Rapporteur : Mme RIAH Nassira

M.C.- UFM Constantine.

Examineurs : Mr BENHIZIA Yacine

Professeur - UFM Constantine.

Année universitaire
2014 - 2015



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie Microbienne

Évaluation de l'efficacité symbiotique de quatre souches de
Rhizobium leguminosarum sv. *viciae* nodulant le pois *Pisum*
sativum.

Présenté et soutenu par :

BENANTAR Fatma Zohra

AYOUNI Rym

Le : 17/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr BENGUEDOUAR Ammar

Professeur - UFM Constantine.

Rapporteur : Mme RIAH Nassira

M.C.- UFM Constantine.

Examineurs : Mr BENHIZIA Yacine

Professeur - UFM Constantine.

Année universitaire
2014 - 2015

REMERCIEMENTS :

Nous adressons nos remerciements à notre encadreur Dr Nacira Riah qu'elle trouve ici le témoignage de notre gratitude et de notre reconnaissance pour ses conseils, ses encouragements et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.

Nous remercions également les membres de jury pour nous avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail : Mr Ammar BENGUEDOUAR Professeur à l'Université à Constantine1 ; président du jury et Mr Yancine Benhayzia Professeur à l'Université de Constantine1 ; examinateur de ce travail.

Nous n'oublions pas d'adresser nos vifs remerciements à Houda , l'ingénieur du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire pour son aide ainsi que toute l'équipe du laboratoire d'écologie microbienne.



Dédicace

Merci mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,

La force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve

Et le bonheur de lever ma main et de dire « YA KARIM »

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents qui m'ont dirigé et suivi

Durant mes années d'étude, et aussi pour leur sacrifice,

Leur patience sans limite et l'éducation qu'il m'ont donnée, je leur dit merci mille fois

Je ne pourrais jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

Mon cher frère : Chakib

Ma chère sœur : Lina

Egalement je dédie ce travail à mes adorables amies :

Nihed , Romaiassa ,Mouny, Sawsan

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aime, A tous que j'aime

Je dédie ce travail





Dédicaces

Au nom de Dieu le Miséricordieux par essence et par excellence

Avant tout je remercie le Dieu le tout puissant.

Je dédie ce mémoire à

Mon fils ; le bonheur et l'espoir de ma vie.

Mon mari qui m'a assisté dans ces moments difficiles et m'a servi d'exemple.

Mes parents

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mon frère et mes sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Monsieur AMMAR BENGUEDOUAR qui ma donné la chance de me réintégrer dans son laboratoire de l'écologie microbienne pendant le cursus de Master.

Mes professeurs de l'UMBB et UMC qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

Tous mes compagnons de promotion



Résumé

Ce travail a été réalisé afin d'étudier l'effet d'inoculation de quatre souches de *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* isolées à partir de nodosités racinaires du pois et de la lentille sur la croissance du pois fourrager. La croissance des plantes a été faite en pots sur sable stérile. L'évaluation de l'infectivité et de l'efficacité des rhizobia était déterminée par analyse de la croissance des plantes en mesurant le poids de la matière sèche des parties aériennes, des racines, et des nodules ainsi que le nombre des nodules. L'effet souche sur le nombre et la biomasse de nodules a révélé que la souche HL1 est la plus infectieuse, alors que TP4 est la moins infectieuse. Ce pendant, l'efficacité la plus élevée est celle enregistrée par la souche TP4 qui se classe dans le même groupe que le témoin azoté. La plante d'origine n'a montré aucun effet sur l'efficacité symbiotique. Une seule corrélation positive a été observée entre la matière sèche et le nombre de nodules.

Mots clés : Pois fourrager, lentille, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, symbiose, efficacité, infectivité.

المخلص

يهدف البحث إلى دراسة تأثير التلقيح بأربع سلالات من الريزوبيوم *Rhizobium leguminosarum sv.viciae* المعزولة من العقد الجذرية لجذور نبات البازلاء والعدس على نمو نبتة البازلاء العلفي. تمت زراعة النباتات داخل أصص تحتوي على رمل معقم. تقييم عدوى وفعالية سلالات الريزوبيا تم بتحليل نتائج نمو النباتات وذلك بقياس الوزن الجاف للأجزاء الهوائية, الجذور والعقد بالإضافة إلى عدد العقد المتكونة على جذور النباتات الملقحة. أظهر تأثير نوع السلالة الملقحة أن السلالة HL1 تعد الأكثر عدوى بينما السلالة TP4 هي الأقل عدوى. في حين أن أعلى مستوى فعالية تم تسجيله لدى السلالة TP4 و التي تصنف في نفس المجموعة مع الشاهد الأزوتي. لم يتم تسجيل أي تأثير لنوع النبتة الأصلية التي تم عزل السلالات منها علي فعالية تثبيت الأزوت لدى النباتات الملقحة. النتائج أظهرت حالة ارتباط ايجابية وحيدة بين الوزن الجاف و عدد العقد الجذرية.

الكلمات المفتاحية:

البازلاء العلفي، العدس، *Rhizobium leguminosarum sv.viciae* ، التعايش، الفعالية، العدوى.

Abstract

This research was realized to study the effect of the inoculation of four strains of *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, isolated from root nodules of pea and lens on the growth of field pea .the growth of plants was realized on a steril sand. The evaluation of efficiency and effectiveness of rhizobia was determinate with analysis of plant growth by measuring the dry weight of aerial parts, roots and nodules and the number of noduls too. The strain effect on nodules biomass revealed that the strain HL1 was the most infective and the strain TP4 , classified with the positif witness was the less effective .However the strain the most efficient was the strain TP4 and the less efficient was the HL1.Only one correlation between the dry weight and nodules number was observed.

Key words

field peas, lens, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, symbiosis, efficiency, infectivity.

Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'azote.....	4
Figure 2. Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses <i>Papilionoideae</i>	7
Figure 3. Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α -, β et γ -protéobactéries. Les genres en gras contiennent le rhizobium nodulant les légumineuses.....	8
Figure 4. Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse.....	9
Figure 5 . Processus du développement du nodule.....	11
Figure 6. Site de prélèvement du sable (oued El kebir-Rhumel.wilaya de Mila).....	13
Figure 7. Graines de pois fourrager germées.....	13
Figure 8. Croissance des 4 souches bactériennes sur le milieu YMA.....	14
Figure 9. Inoculum préparé dans un erlen Meyer.....	14
Figure 10. Eclaircissement des plantes.....	15
Figure 11. La pesée des différents organes de la plante par une balance de précision.....	16
Figure 12. Aspect générale de la croissance des plantes inoculées par les souches BS10 et TP4 comparées au témoin non azoté (témoin négatif) et au témoin azoté (témoin positif).....	17
Figure 13. Aspect générale de la croissance des plantes inoculées par les souches OL13 et HL1 comparées au témoin non azoté (témoin négatif) et au témoin azoté (témoin positif).....	18
Figure 14 . Racines nodulées du pois.....	18
Figure 15. Racines non nodulées correspondant au témoin azoté et au témoin non azoté.....	19
Figure 16. Variation du nombre des nodules selon les souches.....	20
Figure 17. Effet des souches sur la masse des nodules.....	21
Figure 18. Effet des souches et des témoins sur la croissance des parties aériennes.....	22
Figure 19. L'effet des souches sur la croissance de la biomasse racinaire des plantes.....	23
Figure 20. Variation de la plante d'origine sur la croissance de la partie aérienne.....	24
Figure 21. Courbe de corrélation entre le nombre de nodule et la biomasse des nodules.....	25

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches utilisées	12
Tableau 2 : variation des groupes selon le nombre des nodules	19
Tableau 3 : Variations des groupes selon la masse des nodules de nodules	20
Tableau 4 : variation des groupes selon la masse de la partie aérienne.....	22
Tableau 5 : Variation des groupes selon la biomasse racinaire.....	23
Tableau 6 : Variation des groupes selon la plante d'origine	24
Tableau 7 : Matrice de corrélation (coefficients de Pearson) entre les paramètres mesurés pour le pois	25

Table des matières

Introduction	1
--------------------	---

Partie1 : Etude bibliographique

1-Généralités sur la fixation biologique de l'azote.....	2
2-Le cycle de l'azote.....	3
3-Les microorganismes fixateurs d'azote.....	4
3-1-Les fixateurs libres.....	4.
3-2-Les fixateurs symbiotiques.....	5
4-La symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse.....	5
4-1-Les légumineuses.....	5
4-2-Les rhizobia	7
4-3- Spécifié d'hôte.....	9
5-Mécanisme de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse.....	9
5-1-Les bases moléculaire de la symbiose	8
5-2 -Mécanisme de la nodulation	10
6-Evaluation de la symbiose <i>Rhizobium</i> /légumineuse.....	11

Partie 2 Matériel et Méthodes

1-Matériels biologique.....	12
2-Préparation des pots de culture.....	12
3-Réalisation de l'essai.....	13
3-1-Désinfection et germination des graines.....	13
3-2-Préparation de l'inoculum.....	14
3-3-semi des graines et inoculation.....	15
3-4-Arrosage des plantes.....	15
3-5-Eclaircissement des plantes.....	15
4-Les paramètres analysés.....	16
5-Analyse statistique.....	16

Partie 3 : Résultats et discussion

1- Comparaison de l'aspect générale de la croissance des plantes.....	17
2- Evaluation de l'infektivité des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv.viciae.....	18

2-1 Evaluation de l'effet souche sur le nombre de nodules.....	19
2-2- Evaluation de l'effet souche sur la masse de la matière sèche des nodules	20
3- L'évaluation de l'efficience symbiotique des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	21
3-1 Evaluation de l'effet des souches sur la croissance des parties aériennes.....	21
3-2 L'évaluation de l'effet des souches sur la biomasse des parties racinaires.....	22
4- Effet de la plante d'origine des souches sur la croissance des parties aériennes	24
5- Estimation des corrélations entre les différents paramètres mesurés.....	25
Conclusion et perspectives.....	26
Références bibliographique.....	27
Liste des annexes	

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Introduction

L'azote en tant que composant omniprésent dans les biomolécules (protéines, acides nucléiques, vitamines...) est un composant essentiel à la croissance et au développement de tous les organismes. L'atmosphère contient une grande quantité de diazote (79 % en volume), mais cet azote gazeux est très peu disponible pour la plupart des espèces. Cependant, la capacité à fixer l'azote atmosphérique via un complexe enzymatique, la nitrogénase, est restreinte à quelques bactéries.

L'établissement de la symbiose plante-microorganisme est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante hôte (Long, 1996). Les bactéries de la famille des *Rhizobiacées* en général, et particulièrement celles du genre *Rhizobium* peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde, capable de fixer l'azote atmosphérique. L'une des caractéristiques majeures des associations *Rhizobium*-légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de *Rhizobium* donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de *Rhizobium* (Tilak et al. 2005).

L'importance des légumineuses dans la fertilisation des sols était connue pour les agriculteurs, mais ce sont les travaux de Lawes et Gilbert en 1891 qui ont montré la capacité des légumineuses d'enrichir le sol avec de l'azote. Les chercheurs aujourd'hui utilisent le terme d'efficacité symbiotique pour désigner la capacité d'une légumineuse nodulée de fixer l'azote atmosphérique, cela peut être exprimé qualitativement (la taille) ou quantitativement (azote total, poids sec des nodules...). (Somasegaran et Hoben., 1985).

L'objectif de cette présente étude est d'évaluer l'infectivité et l'efficacité symbiotique de 4 souches de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées à partir des nodules racinaires du pois et de la lentille cultivés dans différentes régions de l'est algérien.

1- Généralités sur la fixation biologique de l'azote

Dans les sols, les quantités d'azote assimilables par les plantes sont faibles alors que cet élément constitue souvent, avec le manque d'eau et de phosphate, un principal facteur limitant la croissance des végétaux (Cleland et Harpole, 2010).

L'azote est pourtant très abondant sur la planète puisque l'atmosphère contient 78% de diazote N_2 , mais cette forme est inaccessible à la plupart des êtres vivants. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries, dites diazotrophes, qui possèdent le complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase. En conditions de faible teneur en oxygène, cette enzyme catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac NH_3 (Day et *al.*, 2001 ; Downie, 2005).

Au niveau du sol, les plantes ne peuvent assimiler cet élément que sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) par absorption racinaire. Cet azote assimilable ne représente cependant que 0,001% de l'azote total de la biosphère (Newton, 1998). Ainsi, en agriculture, l'apport d'engrais azotés vise à combler les besoins des cultures. Cependant, il est estimé qu'environ 50 % de cet azote épandu n'est pas absorbé mais lessivé, causant de graves problèmes environnementaux telle que la pollution des nappes phréatiques (Graham et Vance, 2000). Certaines plantes se sont affranchies de ce déficit en azote en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique gazeux. Au cours de cette association à bénéfice réciproque (mutualisme), la plante fournit de l'énergie et généralement une protection à son symbiote, tandis que celui-ci fournit en retour de l'azote sous des formes variées. L'association à bénéfices réciproques que constitue cette symbiose fait intervenir les rhizobia et la plupart des plantes de la famille des légumineuses. L'association provoque la formation d'un organe nouveau, la nodosité (ou nodule) situés sur les racines de la plante. C'est cette nodosité qui est le siège de la fixation de l'azote atmosphérique. (Obaton, 1992).

2-Le cycle de l'azote

L'azote moléculaire entre dans le cycle biologique principalement grâce à l'assimilation par certains microorganismes ; en particulier des bactéries ; ce processus de l'assimilation est appelé la fixation de l'azote. L'azote prend de nombreuses formes dans son trajet au travers de l'écosystème (Figure 1). La première étape du cycle sera :

- **l'ammonification** : C'est la production d'ammonium ou d'ammoniac du fait d'une activité biologique, à partir soit de matière organique en décomposition, soit par la réduction de nitrate.
- **La nitrification** : implique l'oxydation de l'azote, premièrement de l'ammoniaque en nitrite :



Ensuite de nitrite en nitrate : au cours de laquelle l'atome d'azote libère la majeure partie de son énergie chimique potentielle



Chacune de ces étapes est assurée par des bactéries spécialisées ; la première par *Nitrosomonas* dans les sols et *Nitrococcus* dans les systèmes marins ; la seconde par *Nitrobacter* dans les sols et par *Nitrococcus* dans les océans.

- **La dénitrification** : produit principalement de N_2 , mais de faible quantité de NO et N_2O (oxyde nitreux) sont aussi libérés dans l'atmosphère.

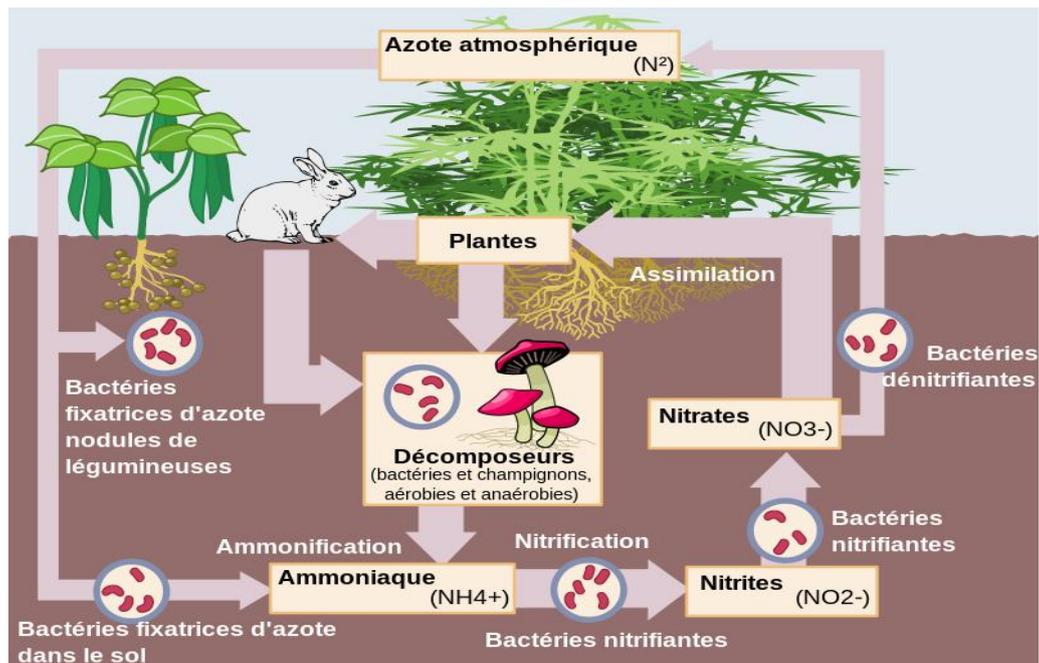


Figure 1 : Cycle de l'azote

3-Les microorganismes fixateurs d'azote

La fixation biologique de l'azote est un caractère répandu chez les procaryotes. En effet, les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires : les archaebactéries et les eubactéries (Young, 1992). Certains fixateurs d'azote sont associés à des plantes ou vivent à l'état libre dans le sol et les eaux.

3-1 Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres variés: bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*). Ces associations vont de la simple multiplication bactérienne à la surface de la racine à la colonisation des espaces intercellulaires, caractéristiques des bactéries endophytes. C'est le cas par exemple de la colonisation par *Azospirillum* des espaces intercellulaires de l'épiderme et du cortex racinaire du maïs et du sorgho (Kennedy et al., 1997)

3-2 Les fixateurs symbiotiques

Dans le cadre du mutualisme, deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes : les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries filamenteuses Gram positif du genre *Frankia* (Benson et Dawson, 2007 ; Franche et *al.*, 2009), et les légumineuses qui s'associent aux rhizobiums bactéries unicellulaires gram négatif. Dans les deux cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines, parfois sur les tiges.

4- La symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret et *al.*, 2000 ; Gibson et *al.*, 2008). L'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses est très diverse et implique de nombreuses espèces chez les deux partenaires, végétal et bactérien.

4-1 Les légumineuses

La capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia est limitée aux plantes de la famille des légumineuses appelés aussi *Fabaceae*. La seule exception connue est le genre *Parasponia* de la famille des *Ulmaceae* (Trinick, 1988). La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae*. la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous famille des *Papilionoideae* (De Faria et *al.*, 1989). Les membres de cette sous-famille sont principalement des herbacées.

Les légumineuses sont une source importante de protéines végétales surtout parmi les populations les plus pauvres des pays en développement, elles sont également utilisées en assez grandes quantité pour l'amélioration de l'alimentation animale. Elles jouent aussi un grand rôle dans le système de culture en raison de leur aptitude à pousser en sec dans des terres pauvres et à fixer l'azote dans le sol. (FAO 1995).

-*Pisum sativum*

Pisum sativum est une plante herbacée annuelle qui appartient à la sous famille des *papilionoideae* et à la famille des *Fabacée*. L'espèce *Pisum sativum* fournit plusieurs types d'aliments tant pour l'homme que pour les animaux (Benoît et *al.*, 2006 ; Brink et Belay, 2006) . La culture du pois a besoin d'un climat relativement frais ; les températures moyennes doivent être comprises entre 7-24°C. *Pisum sativum* est cultivé dans les régions où les précipitations ne dépassent pas 400 mm, mais la pluviométrie idéale se situe entre 800 et 1000 mm par an. Le pois est légèrement sensible à la photopériode, les jours longs favorisant la floraison. Il pousse sur des sols de toutes natures, dotés de niveaux de fertilité modérés, bien drainés et à pH de 5,5 à 7 (Brink et Belay, 2006).

L'espèce *Pisum sativum* appartient au genre *Pisum*, classé dans la tribu des *Fabeae* (ou *Viciae*) (Zhu et *al.*, 2005) (Figure 2), qui regroupe diverses espèces de plantes herbacées annuelles, réparties en cinq genres : *Lathyrus* L. (gesse/pois doux, environ 160 espèces), *Lens* (lentilles, 4 espèces), *Pisum* L. (pois, 3 espèces), et *Vicia* L. (vesces ; environ 140 espèces) et le genre monotypique *Vavilovia* (Smýkal et *al.*, 2011). Les légumineuses à graines ont toujours été une composante essentielle dans les systèmes de culture du bassin méditerranéen. Outre leur rôle agronomique dans les rotations culturales notamment avec les céréales, ces cultures présentent des intérêts nutritionnels, économiques et environnementaux (Tivoli,1997).

La taxonomie du *Pisum sativum* est la suivante (ITIS, 2013) :

Règne :Plantae

Sous règne :Viridaeplantae

Infra-règne :Streptophytae

Division :Tracheophytae

Sous-division :Spermatophytina

Infra-division :Angiospermae

Classe :Mongoliopsidae

Super –ordre :Rosanae

Ordre :Fabales

Famille :Fabaceae

Genre :*Pisum*

Espèce :*Pisum sativum*

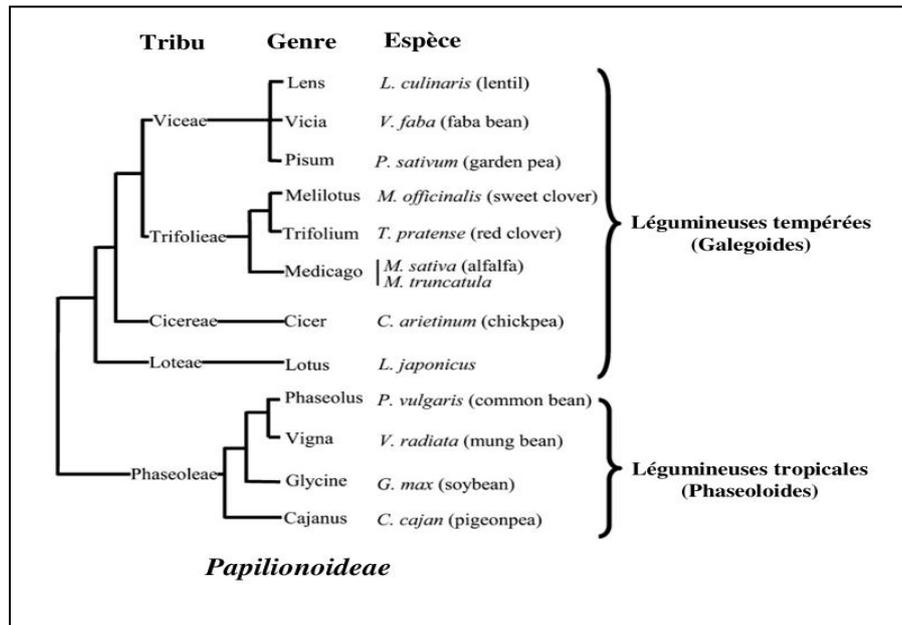


Figure 2 : Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses *Papilionoideae* (Zhu et al., 2005).

4-2 Les rhizobia

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie appelée « *Rhizobium* ». *Rhizobium* décrit au XIXème siècle comme une bactérie qui vit dans le sol avec le potentiel de noduler des légumineuses (Frank, 1889). Les rhizobia étaient initialement caractérisés par leur vitesse de croissance: on distinguait ainsi le genre *Rhizobium* contenant des souches à croissance rapide, et qui devait plus tard se subdiviser en plusieurs genres (*Rhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*), et le genre *Bradyrhizobium* contenant des souches à croissance lente (Jordan, 1982, 1984). Actuellement, les rhizobia comportent 13 genres et plus de 98 espèces, tous classés dans les protéobactéries (α et β) (Figure 3, <http://www.rhizobiums.co.nz/taxonomy/rhizobiums.html>). Ce nombre ne cesse d'augmenter depuis quelques années, notamment grâce à l'apparition de nouveaux outils de taxonomie moléculaire et une exploration plus large de la diversité dans différentes zones du monde à forte biodiversité.

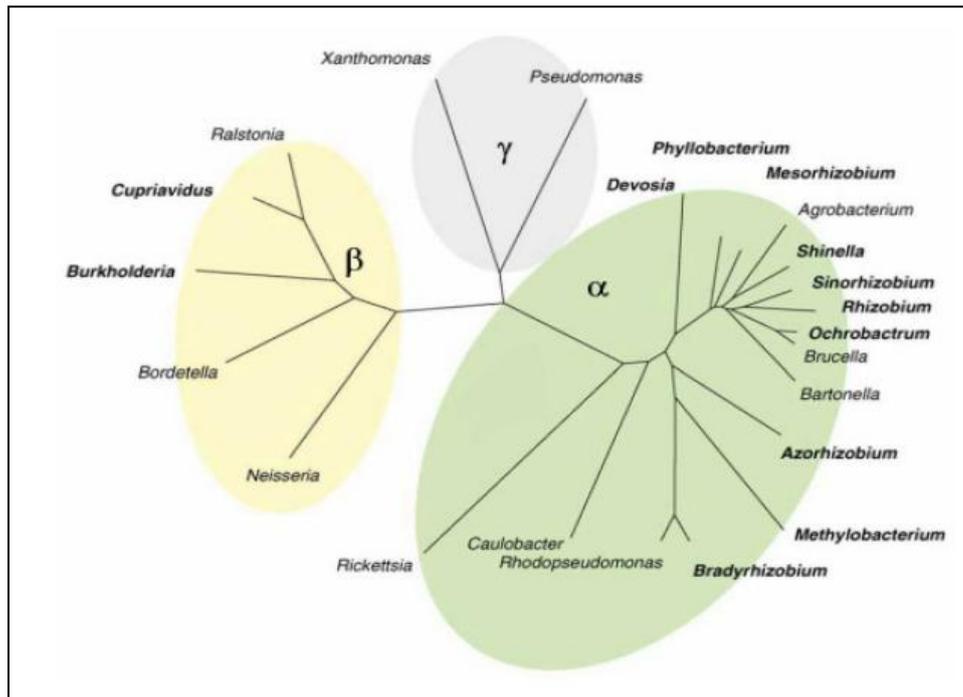


Figure 3 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α -, β et γ -protéobactéries. Les genres en gras contiennent les rhizobium nodulant les légumineuses (Masson-Boivin et *al.*, 2009).

- Rhizobia associés au pois

Les légumineuses de la tribu des *Viciae* (*Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*...) ont longtemps été considérées comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce bactérienne, *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae*. Cette classification a changé depuis 2008, d'autres espèces de *Rhizobium* ont été décrites pour des souches capables de noduler certaines espèces de légumineuses de la tribu des *Viciae*, comme *Rhizobium fabae*, isolé à partir de nodules *Vicia faba* en Chine et capable de noduler le pois (Tian et *al.*, 2008). Une souche nodulant *Pisum* et d'origine géographique inconnue a été classée dans une nouvelle espèce, *Rhizobium pisi* (Ramirez-Bahena et *al.*, 2008). Yang et *al.* (2008) ont identifié 2 souches parmi 42 nodulant *Pisum* cultivé en Chine comme *Rhizobium etli*, connu comme symbiote efficace du haricot (Segovia et *al.*, 1993). Enfin, très récemment une nouvelle espèce nodulant *Vicia faba* dans différentes régions géographiques (Espagne, Pérou et Tunisie) a été proposée dans le genre *Rhizobium*. *Rhizobium laguerreae* (Saïdi et *al.*, 2014).

4-3 La Spécificité d'hôte

L'interaction *Rhizobium*-Légumineuse est caractérisée par la spécificité avec laquelle elle s'établit. En général, chaque Légumineuse ne peut être infectée que par un nombre restreint de souches de rhizobia et réciproquement, chaque souche de rhizobia ne peut infecter qu'un nombre limité de genres de Légumineuses. Cependant, le degré de spécificité d'une souche est très variable, pouvant aller de quelques hôtes, comme le genre *Galega* qui ne forme des nodules qu'avec *Rhizobium galegae* (Lindstrom, 1989), à plus d'une centaine d'hôtes, comme la souche d'*Ensifer* sp, capable de s'associer avec près de 112 genres de légumineuses et même le genre *Parasponia*. (Stanley et Cervantes, 1991).

5- Mécanismes de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse

5-1 Les bases moléculaires de la symbiose

L'établissement de la reconnaissance *Rhizobium*-légumineuse est sous le contrôle de signaux échangés entre les deux partenaires (Figure 4). Les flavonoïdes libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire ; ils sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD. L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (nodbox). Les gènes *nod* codent pour des enzymes impliqués dans la biosynthèse des facteurs Nod, qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante. Les facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire (Lindström et al., 2010).

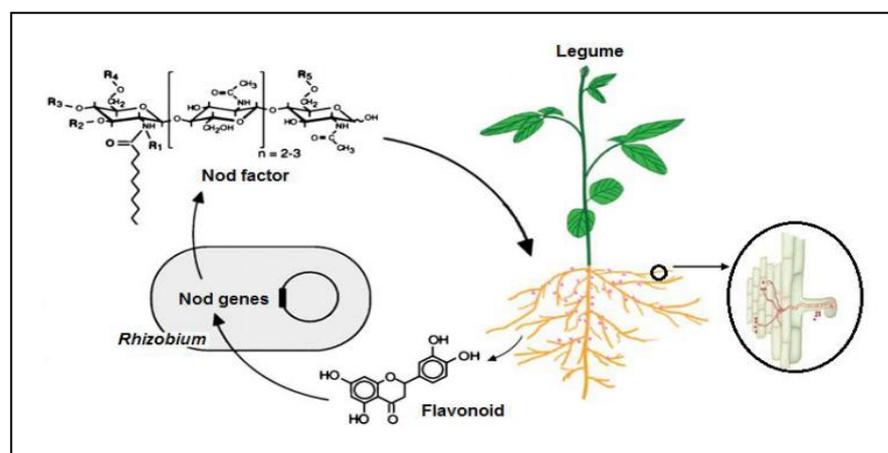


Figure 4 : Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse.

5-2 Mécanisme de la nodulation

Le processus d'infection des racines d'une légumineuse et la formation des nodules suivent des étapes majeures bien définies (Figure 5). L'étape préalable à l'infection s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires dont l'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère. La pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire appelé « crosse de berger » formant ainsi une micro-niche favorable à la prolifération de la bactérie, elle est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. Une croissance apicale inverse se met alors en place, formant un passage long et étroit appelé le cordon d'infection, dans lequel les bactéries se divisent. Les cellules racinaires végétales du cortex et du péricycle entrent en division et forme un primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, qui se différencie ensuite en nodule mature (Trevaskis, 2002). A l'intérieur du nodule, la bactérie se différencie en bactéroïde, forme sous laquelle elle est capable de réduire l'azote atmosphérique en ammonium (Mergaert et *al.*, 2006 ; Gage 2004).

En général, il existe deux types de nodules provoqués par les rhizobia : les nodules déterminés caractéristiques des espèces tropicales (soja, haricot...) et les nodules indéterminés, retrouvés parmi les espèces des climats tempérés (pois, luzerne, trèfle...) (Ferguson et *al.*, 2010).

- Chez les espèces à nodules déterminés, les divisions cellulaires à l'origine du primordium nodulaire ont lieu au niveau du cortex externe. La persistance du méristème chez ces espèces est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Ce processus se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules
- Les nodules indéterminés sont formés à partir du cortex interne, généralement par les plantes utilisant la voie formant des cordons d'infection intracellulaire. Ils sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant. Ce qui se traduit par des nodules de forme allongée. Elles possèdent une structure plus complexe que les nodosités de type déterminé.

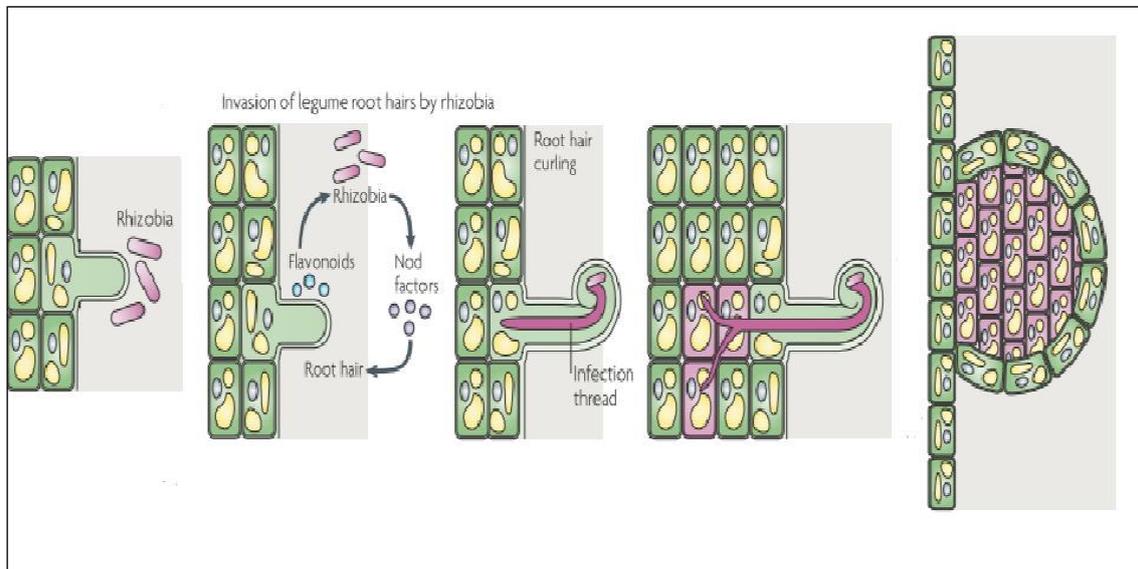


Figure 5 : Processus du développement du nodule (Deakin et Broughton, 2009).

6- Evaluation de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses

Lorsque l'on inocule des légumineuses avec une souche de *Rhizobium* il convient de se demander si celle-ci s'est véritablement implantée sur le système racinaire de la légumineuse. Il existe en effet un certain nombre de sols dans lesquels des souches de *Rhizobium* sont présentes mais ne sont pas fixatrices. Dans ces sols l'inoculation avec une souche sélectionnée sur son aptitude à fixer l'azote n'est pas toujours bénéfique car la souche apportée entre en compétition avec les souches indigènes pour la formation des nodosités. Il convient alors de sélectionner les souches fixatrices sur son un second caractère : leur pouvoir de compétition pour la nodulation. Cette approche est impérative car les souches les plus fixatrices ne sont pas impérativement les plus compétitives et un certain nombre d'échecs dans des essais d'inoculation est certainement imputable au mauvais choix des souches.

L'efficacité d'une souche de *Rhizobium* est définie par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique chez la légumineuse hôte, et donc indirectement par ses effets sur la croissance de cette dernière. Différentes méthodes sont utilisées pour estimer l'activité fixatrice : par comparaison des poids secs des différentes parties des plantes inoculées par une souche de *Rhizobium* et des plantes non inoculées, le dosage de l'azote total, mesure de l'activité réductrice d'acétylène ou les méthodes isotopiques.(Neyra, 1992).

MATERIELS ET METHODES

1- Matériel biologique :

-Quatre souches de *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* isolée par DR Riah Nassira été utilisées pour l'inoculation du pois (Tableau 1). Ces souches ont été isolées à partir des nodules du pois *Pisum sativum* et de la lentille *Lens culinaris* cultivées dans différentes régions situés à l'est algérien.

Souches	Plante d'origine
HL1	Lentille
BS10	Pois
TP4	Pois
OL13	Lentille

Tableau 1 : Souches utilisées

- L'étude a été menée sur une variété de pois fourrage (*Pisum sativum*) appelée Sefrou, c'est une variété introduite en Algérie et elle a été sélectionnée au Maroc.

2- Préparation des pots de culture

L'évaluation de l'infectivité et de l'efficacité a été réalisée en pot sur sable stérile.

- Le sable utilisé provient de l'oued El kbir Rhumel (Figure 6) situé à une quarantaine de kilomètres au nord de Constantine, il a été bien lavé et stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

- Des pots en matière plastique de 3 litres ont été désinfectés à l'eau de javel, puis à l'éthanol (95%). Les pots ont été remplis avec du sable imbibé avec la solution nutritive dépourvue d'azote (Annexe 1) et d'une fine couche de gravier stérile déposée au fond pour assurer le drainage.

-Chaque pot avec sa coupelle ont été placés dans un sachet en plastique pour éviter les contaminations entre les pots.

- Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Un témoin non azoté ne recevant pas l'inoculum et un témoin azoté recevant de l'azote combiné sous forme de KNO_3 à une concentration finale de 5mM par litre de solution nutritive.



Figure 6: Site de prélèvement du sable (oued El kebir-Rhumel, wilaya de Mila).

3-Réalisation de l'essai

3-1 Désinfection et germination des graines

Les graines de pois ont été désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 5 min, rincées à l'eau stérile et laissées dans la dernière eau de rinçage pendant 1 heure, puis mises à germer en obscurité dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée stérile à 1% à 25°C durant 3 jours.(Figure 7).



Figure 7 : graines de pois fourrager germées

3-2-Préparation de l'inoculum

Des colonies bactériennes correspondant à chaque souche de *Rhizobium* ont été obtenu après 48 heures de croissance (phase exponentielle) sur boîtes de Pétri contenant le YMA (Figure 8) (Annexe 2). Dans un erlen meyer, les colonies bactériennes sont diluées avec de l'eau distillée stérile pour l'obtention d'une suspension bactérienne de 10^7 cellule/ml (Figure 9). La pureté de l'inoculum a été vérifiée par croissance de cette suspension sur YMA à 28°C pendant 2–3 jours.

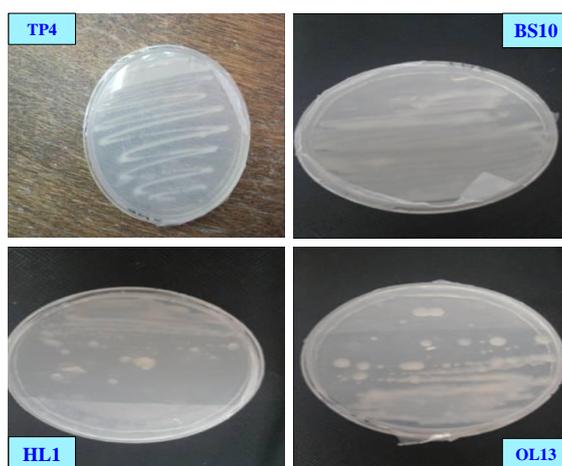


Figure 8 : Croissance des 4 souches bactériennes sur le milieu YMA

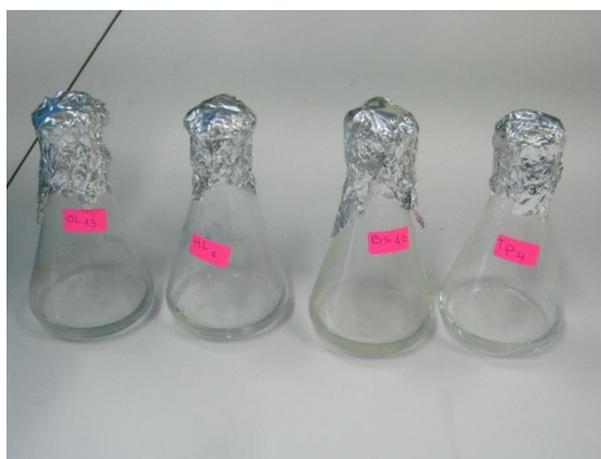


Figure 9 : Inoculum préparé dans un erlen meyer

3-3 Semi des graines et inoculation

- Les graines ayant une radicelle d'environ 1 cm ont été transférées aseptiquement dans les pots remplis de sable stérile à raison de 8 graines par pot.
- Dans le but de déterminer l'influence des bactéries symbiotiques sur la croissance du pois fourrager, la suspension bactérienne a été apportée à raison de 1 ml ($\sim 10^7$ cellule) par graine.
- Les pots ont été répartis dans des blocs aléatoires et placés dans une chambre de culture.

3-4 Arrosage des plantes

L'arrosage des plantes inoculées et du témoin négatif a été assuré par une solution nutritive minérale sans azote, alors que le témoin positif est arrosé par la même solution additionnée de 5mM de KNO_3 à raison de deux fois par semaine, et à chaque fois, le pH de la solution a été ajusté à 6,8 avec une solution de NaOH à 1 M ou de HCl à 1 M.

3-5 Eclaircissement des plantes

A la levée des plantes, on ramène leur nombre à 4 par pot en faisant stériliser les mains par lavage à l'alcool lors du passage d'un pot à un autre pour éviter les contaminations (Figure 10).

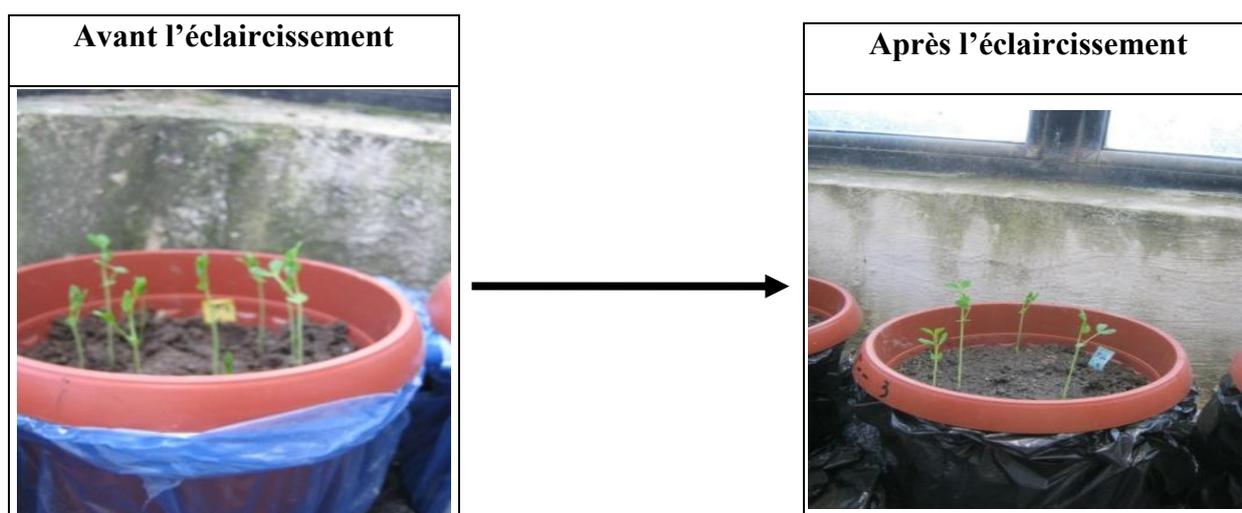


Figure10: Eclaircissement des plantes

4- Les paramètres analysés

Les plantes ont été récoltées manuellement après 8 semaines de croissance (stade floraison), une plante représentative par pot a été utilisée pour la collecte et le comptage des nodules. Les racines ont été délicatement rincées à l'eau de robinet, puis séchées avec du papier absorbant. Le poids sec des parties aériennes, des racines et des nodules a été mesuré après séchage au four à 70°C pendant 72 h, en utilisant une balance de précision (Figure 11).



Figure 11 : La pesée des différents organes de la plante par une balance de précision.

5- Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2015) pour les paramètres mesurés sur les plantes échantillonnées. Les moyennes ont été classées en utilisant le test de Fisher (LSD : Least significant difference) avec un niveau de probabilité de 0.05. Des corrélations entre les différents paramètres ont également été effectuées à l'aide du logiciel Excel.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Comparaison de l'aspect générale de la croissance des plantes

Les résultats obtenus ont montré un effet favorable du nitrate sur la croissance de la partie aérienne du témoin azoté par comparaison aux plantes inoculées et témoin non azoté (Figure 12 et 13). Baundreau et Dommergues (1971) ont montré que l'aspect de la croissance des plantes donne une idée approximative de l'efficacité de la symbiose fixatrice de l'azote. Une symbiose efficace se traduit par une plante vigoureuse et bien verte. Une symbiose inefficace se traduit par une plante chétive et manquante de chlorophylle.



Figure 12: Aspect générale de la croissance des plantes inoculées par les souches BS10 et TP4 comparées au témoin non azoté (témoin négatif) et au témoin azoté (témoin positif).



Figure 13: Aspect générale de la croissance des plantes inoculées par les souches OL13 et HL1 comparées au témoin non azoté (témoin négatif) et au témoin azoté (témoin positif).

2- Evaluation de l'infectivité des souches de *Rhizobium leguminosarum sv.viciae*

L'évaluation de l'infectivité de chaque souche après inoculation du pois a été estimée par la présence de nodules de couleur rouge brun sur les racines des plantes (Figure 14) par comparaison au témoin azoté et témoin non azoté (Figure 15), qui n'ont présenté aucun nodule sur leurs systèmes racinaires. Les résultats montrent que le pois a pu être nodulé par toutes les souches testées isolées du pois et de la lentille. Ceci s'explique par le fait que le pois est un spectre d'hôte de *Rhizobium leguminosarum sv. viciae* quelque soit la plante d'origine d'isolement (Rogel et al., 2011).



Figure 14 : Racines nodulées du pois



Figure15 : Racines non nodulées correspondant au témoin azoté et au témoin non azoté

2-1 Evaluation de l'effet souche sur le nombre de nodules

L'infectivité d'une souche de *Rhizobium* peut être aussi déterminé par le dénombrement de nodules induits par la souche sur les racines de la plante hôte. Le nombre moyen de nodules par plante est compris entre 13 pour la souche TP4 et 23 pour la souche HL1 qui se révèle la plus infectieuse (Figure 16) (Tableau 2). Malgré cet écart, l'analyse de la variance du nombre de nodules n'a montré qu'une tendance significative entre les souches ($p < 0,08$). Les souches portant les mêmes lettres sur la colonne de l'histogramme de la figure 16 ne sont pas significativement différentes entre elles et font partie d'un seul groupe. Plusieurs chercheurs ont montré que la variabilité des souches de *Rhizobium leguminosarum* influencent le nombre de nodules chez le pois (Laguerre et *al.*, 2007 ; Géraldine et Laguerre, 2008 ; Ali et *al.*, 2008).

Tableau 2 : Variation des groupes selon le nombre de nodules

Souches	Moyenne estimée	Groupes
HL1	23.333	A
BS10	19.333	AB
OL13	19.000	AB
TP4	13.000	B

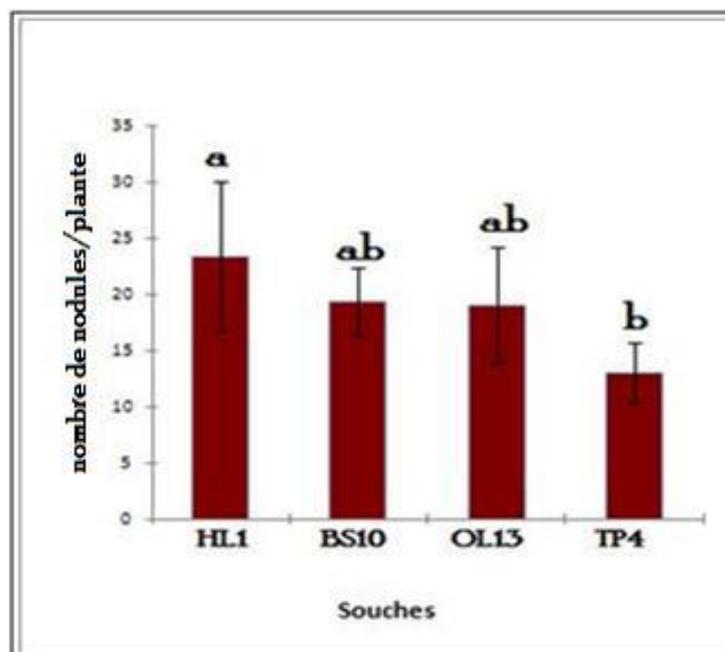


Figure 16 : Effet des souches sur le nombre de nodules.

2-2- Evaluation de l'effet souche sur la masse de la matière sèche des nodules

L'analyse statistique du poids sec des nodules récoltés à partir des racines des plantes correspondant aux différentes souches a montré une différence très significative ($P < 0.005$) entre les souches. La comparaison des moyennes par le test de Fisher a permis de distinguer plusieurs groupes de souches qui diffèrent significativement entre eux. La souche HL1 présente la masse (1.36 mg) la plus élevée des nodules en comparaison aux autres souches qui se classent dans le même groupe (Figure, 17) (Tableau 3). Le même résultat a été observé par Laguerre et al (2007).

Tableau 3 : Variation des groupes selon la masse des nodules

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
HL1	1.367	A
BS10	0.800	B
OL13	0.567	B
TP4	0.533	B

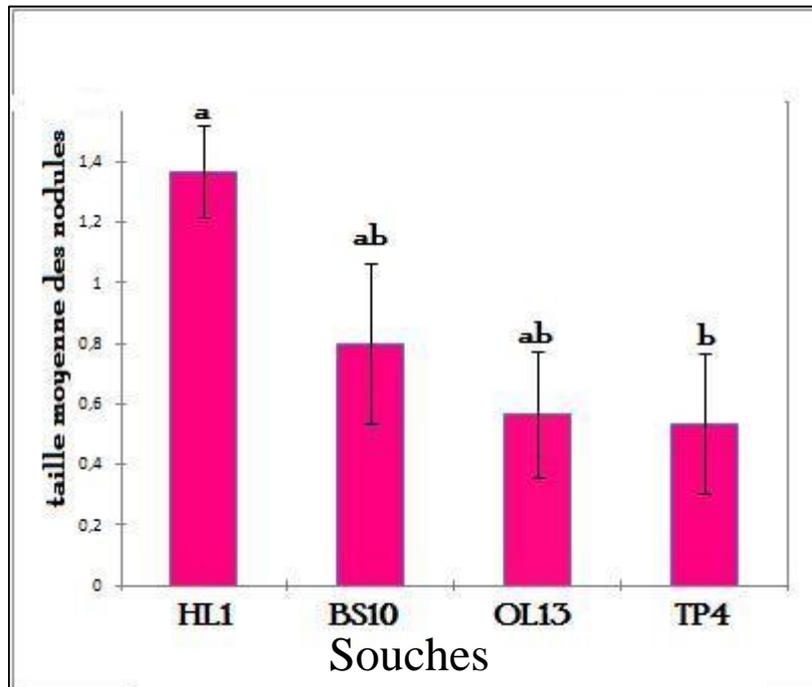


Figure 17 : Effet des souches sur la masse des nodules

3- L'évaluation de l'efficacité symbiotique des souches de *Rhizobium leguminosarum*

L'évaluation symbiotique est réalisée par analyse de la croissance des plantes en mesurant le poids de la matière sèche des parties aériennes et des racines. Les analyses de variance et les erreurs standards des moyennes ont été réalisées pour déterminer la signification ($p < 0,05$) des différences entre les traitements.

3-1 Evaluation de l'effet des souches sur la croissance des parties aériennes

L'analyse de la variance de la matière sèche des parties aériennes a montré une tendance significative entre les souches ($p < 0,09$). La comparaison des moyennes par le test de Fisher met en évidence trois groupes de souches. L'efficacité la plus élevée est celle enregistrée par la souche TP4 (256,533 mg) qui se classe dans le même groupe que le témoin azoté (tableau 4) (Figure 18). Cependant l'efficacité la moins élevée est celle enregistrée par la souche HL1 (moyenne = 141,667 mg) se trouve dans le même groupe que le témoin non

azoté. L'augmentation du rendement en poids sec des parties aériennes du pois inoculé par différentes souche de *Rhizobium leguminosarum* a été soulignée par de nombreux chercheurs (Labidi et al., 2003 ; Laguerre et al., 2007 ; Géraldine et Laguerre, 2008).

Tableau 4 : variation des groupes selon la masse de la partie aérienne.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
TP4	256.533	A
TA	252.567	A
OL13	189.467	AB
BS10	182.033	AB
HL1	141.700	B
TN	141.667	B

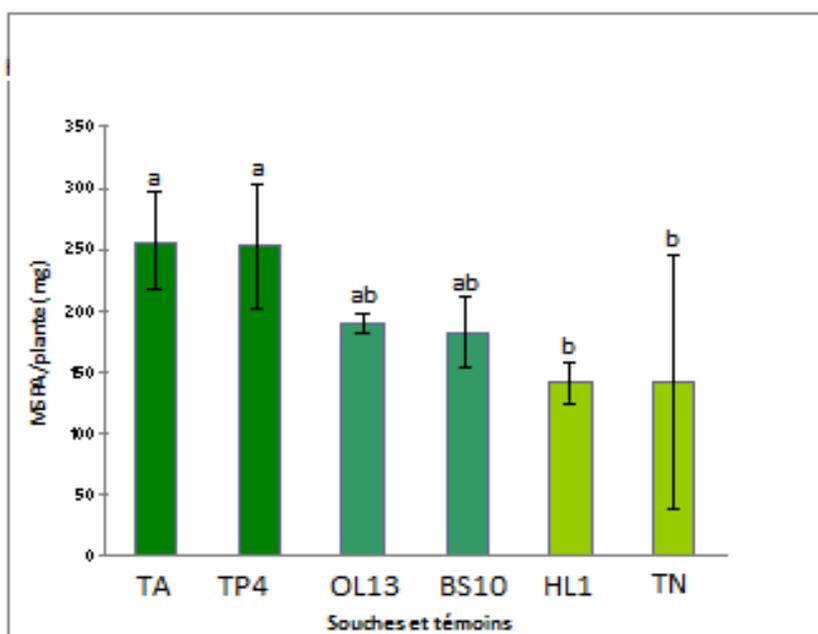


Figure 18 : Effet des souches et des témoins sur la croissance des parties aériennes

3-2 L'évaluation de l'effet des souches sur la biomasse des parties racinaires

La comparaison des moyennes entre elles par le test de Fisher met en évidence un seul groupe (tableau 5). Les souches et les témoins portant la même lettre sur l'histogramme de la figure 19 ne sont pas significativement différents. La masse des racines n'influence pas l'efficacité.

A l'inverse Laguerre et *al.* (2007) ont souligné une différence significative de l'effet des souches sur la croissance des racines.

Tableau 5 : Variation des groupes selon la biomasse racinaire

Souches	Moyenne estimée	Groupes
TN	28.143	A
TA	27.624	A
TP4	25.735	A
HL1	24.421	A
BS10	23.781	A
OL13	23.228	A

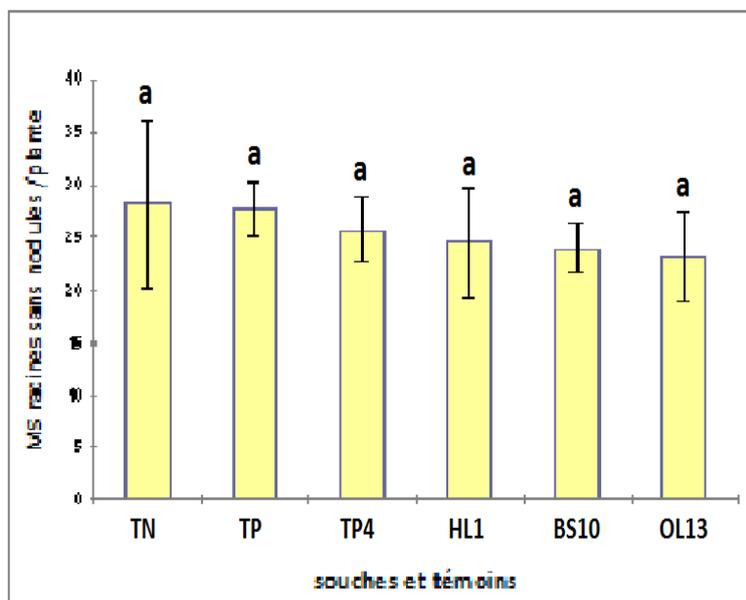


Figure 19 : l'effet des souches et témoins sur la croissance de la biomasse racinaire

Il ressort de nos résultats que la souche la plus infectieuse HL1 est la moins efficace et la souche la moins infectieuse TP4 est la plus efficace, ceci s'explique par le fait que le nombre de nodules n'influence pas la croissance de la partie aérienne. Bien que certains chercheurs ont trouvé une corrélation entre le nombre des nodules ou la matière sèche des

nodules et l'accroissement du poids sec des parties aériennes (Laguerre et *al.*, 2007 ; Géraldine et Laguerre, 2008).

4- Effet de la plante d'origine des souches sur la croissance des parties aériennes

Selon les résultats obtenus, la plante d'origine d'où notre souche a été isolée n'a aucun effet sur l'efficacité symbiotique de cette dernière. Les plantes sont regroupées ensemble et forment un seul groupe (Figure 20) (Tableau 6). L'origine géographique de chacun des 4 souches ne semble pas jouer un rôle majeur sur la nodulation et l'efficacité de la symbiose. Ceci ne peut être confirmé qu'en présence d'un échantillonnage élevé.

Tableau 6 : Variation des groupes selon la plante d'origine

Souches	Moyenne estimée	Groupes
pois fourrager	219.283	A
lentille	169.300	A

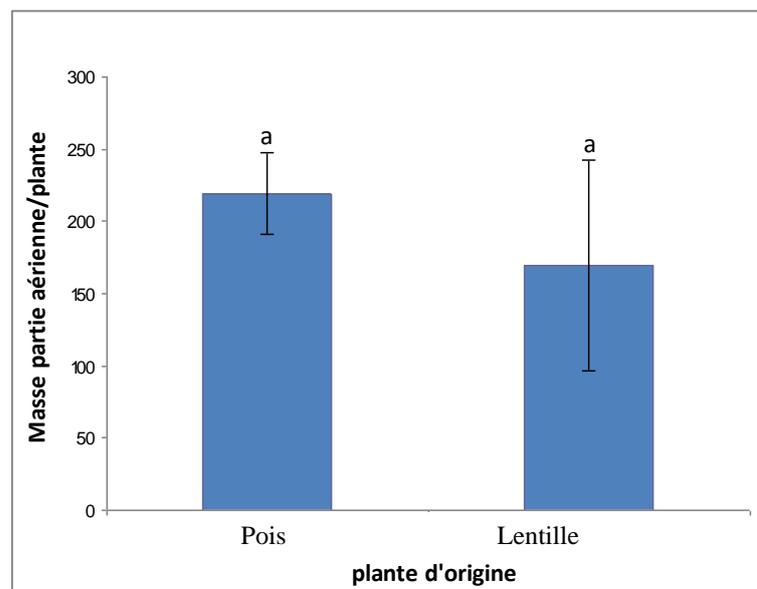


Figure 20 : Effet de la plante d'origine sur la croissance de la partie aérienne

5- Estimation des corrélations entre les différents paramètres mesurés

L'analyse des corrélations des différents paramètres mesurés au stade floraison n'a montré aucune corrélation les différents paramètres, à l'exception d'une seule corrélation positive entre le nombre des nodules et la matière sèche des nodules (Tableau 7, Figure 21). A l'inverse une corrélation négative entre ces deux paramètres a été observé par Laguerre et (2007) chez le pois inoculé par différentes souches. Ceci a été à été expliqué par le phénomène de régulation par la plante des nodosités formées.

Tableau 7 : Matrice de corrélation (coefficients de Pearson) entre les paramètres mesurés pour le pois.

Variables	Nombre de nodules	MS nodulaire	MS racinaires	MS parties aériennes
Nombre de nodules	1	0.59*	0.359	-0.556
MS nodulaire		1	0.246	-0.492
MS racinaires			1	-0.131
MS parties aériennes				1

* La valeur en gras est significativement différente de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

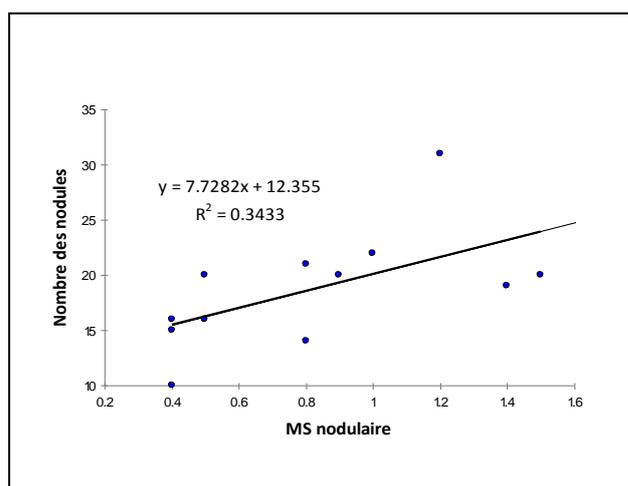


Figure 21 : courbe de corrélation entre le nombre de nodule et la biomasse des nodules.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Nous avons effectué une caractérisation symbiotique afin d'évaluer la diversité des souches de *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae* nodulant le pois fourrager par leur infectivité et efficacité dans le but de sélectionner les souches les plus fixatrices d'azote.

L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre et la biomasse de nodosités formées sur la racine de chaque plante. L'efficacité de la symbiose fixatrice d'une souche est son aptitude plus ou moins grande à fixer l'azote atmosphérique. L'efficacité est estimée par la détermination de biomasse de la matière sèche des parties aériennes des plantes inoculées par rapport au témoin azoté et non azoté.

Une bonne efficacité des rhizobies est le premier critère à retenir pour les sélectionner dans la perspective de préparer d'un inoculum efficace. Nos résultats montrent que parmi les souches inoculées, la TP4 est la plus efficace, elle peut former un couple symbiotique performant avec la variété de pois fourrager testé et peut augmenter le rendement de la symbiose.

Il serait nécessaire d'évaluer les paramètres symbiotiques des souches efficaces par le dosage de l'azote de leurs parties aériennes.

Enfin ce travail devrait être complété par des études de compétition entre les souches efficaces pour la nodulation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ali BK, Labidi M, Dahmane HBM, Khiari L & Darakhshan A. 2003 .Soil P-status and cultivar maturity effects on pea-Rhizobium symbiosis. *Plant and Soil*252: 339–348.

Baudrau J et Dommergeus Y. 1971. Mesure in situ de l'activité nitrogénasique. *C.R. Acad . Sci., Paris, 273, D, 220-2023.*

Benoît M, Deffontaines J-P, Lardon S. 2006. Acteurs et territoires locaux. Vers une géoagronomie de l'aménagement. Collection Savoir- Faire, Inra.

Benson DR, Dawson JO . 2007. Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic Frankia and its host plants. *Plant Physiology.* 130: 318–330.

Brink M, Belay G. 2006 . Céréales et légumes secs, ressources végétales de l'Afrique tropicale .Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P: 102.

Cleland E E, Harpole W S. 2010. Nitrogen enrichment and plant communities. *New York Academy of Sciences.* 1195: 46 –61.

Day D A, Poole P S, Tyerman S D, Rosendahl L. 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 58: 61–71.

Deakin WJ, Broughton WJ. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology.* 7: 312 –20.

De Faria S, Lewis G, Sprent J, Sutherland J. 1989. Occurrence of nodulation in the *Leguminosae* . *New Physiologist.* 111: 607 –619.

Downie JA. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology .*15 : 6.

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology.* 52: 61 –76.

Franché C, Lindström K, Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. 321 :35 –59.

Frank B. 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges*. 7: 332 –346.

Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*.68: 280 -300.

Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*.42 :413 –441.

Graham PH, Vance CP. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*.65: 93 –106.

Jordan DC. 1984. Family III. Rhizobiaceae. In:Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore 234 –242.

Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov .a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants .*Int.J. Syst. Bacteriol*. 32 :136–139.

Kennedy IR, Pereg-Gerk L L, Wood C ,Deaker R, Gilchrist K.and Katupitiya S. 1997. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *azospirillum* and wheat. *Plant and soil*.194 : 65 -7.

Laguerre G, Géraldine D, Bourion V and Duc G. 2007 *Rhizobium leguminosarum* by. *Viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytologist*. 176: 680 –690.

Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial Microbe -host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*. 161: 453–463.

Lindström K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 39: b365 –367.

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes :how many *Rhizobium* recipes. Trends Microbiol.17: 458 –466.

Mergaert P,Uchiumi, T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset A.E, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A.and Kondorosi E. 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 103,5230-5235.

Newton WE. 1998 .Nitrogénases : fonction et évolution. Bull.Soc. Fr.Microbiol.13: 238 – 241.

Neyra M. 1992. Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse-rhizobium. Front Cover · Food & Agriculture Org.

Obaton M. in .Neyra M.1992. Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse-Rhizobium. Food & Agriculture Org. ONU, Rome, 1992.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity .Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64 :180 –201.

Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2008. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R.leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 58 : 2484 –2490.

Riah N. 2014. Genotypic and symbiotic diversity of *Rhizobium* populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria .Systematic and Applied Microbiology. Mentouri University Constantine. Elsevier.P8.

Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*. 34: 96–104.

Saidi S, Ramirez-Bahena MH, Santillana N, Zuniga D, Alvarez-Martinez E, Peix A, Mhamdi R, Vela'zquez E. 2014. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 : 242–247.

Segovia L, Young JPW, Martínez-Romero E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*. 43: 374–377.

Stanley J, Cervantes E. 1991. A review: biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of applied bacteriology*. 70: 9–19.

Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. 9: 4–18.

Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, Gu JG, Chen WX. 2008. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 2871–2875.

Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena AK, Shekhar, Nautiyal, C, Mittal, S, Tri pathi, AK, Johri, BN, 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89:136-150.

Tivoli B, Caubel G. 1997. Les légumineuses alimentaires méditerranéennes: contraintes biotiques et potentialités de développement : Rennes (France), 20-22 février 1997 : 2e séminaire GRAM Université de Cornell. *Volume 88 de Colloques de l'INRA*.

Trinick MJ, Hadobas PA. 1988. Biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. *Plant Soil*, 110:177–185.

Trevaskis B, Colebatch G, Desbrosses G, Wandrey M, Wienkoop S, Saalbach G, Udvardi M. 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. *Comparative and Functional Genomics*. 3 : 151 –157.

Weir BS. 2011. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: 2 May, 2013.

Yang CY, Yang JK, LI YG, Zhou JC. 2008. Genetic diversity of root-nodulating bacteria isolated from pea (*Pisum sativum*) in subtropical regions of China. *Sci. China Ser. C-Life Sci*. 51: 854 –862.

Young J. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological nitrogen fixation*. 43–86.

Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC. 2005. Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology*. 137: 1189 –1196.

ANNEXES

Annexe1

- **Solution de culture des plantes** (Solution nutritive de Fahraeus, Vincent, 1970) :

Inscription dans les collèges locaux, 2005

Eléments	PM	Solution finale	Solution mère g /L	ML DE SOLUTION Mère /l de sol finale
Macro-éléments				
KH ₂ PO ₄	138.69	0.1	13.6	1
Kcl	74.55	3	223.65	1
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	147.02	2	294.04	1
MGSO ₄ ;(H ₂ O) ₇	246.48	1	246.48	1
Micro-elements		μM		
H ₃ bo ₃	61.8	4	6.25	
Mnso ₄ ,H ₂ O	169	6	25	0.2ml /5l
ZnSo ₄ , (H ₂ O) ₇	287.54	0.9	6.25	(0,04ml /l)
CuSo ₄ ;(H ₂ O) ₅	249.68	1	6.25	
Na ₂ moo ₄	241.95	0.1	0.625	
Sequestrene de fer			16.6	1

Annexe 2 :

Milieus utilisés

- **milieux de culture bactérienne :**

Milieu liquide YMA (Yeast Mannitol Agar, Vincent, 1970) :

Mannitol 10.0 g

K₂ HPO₄ 0.5 g

MgSO₄.7H₂O 0.2 g

NaCl 0.1 g

Extrait de levure 0.5 g

H₂O distillée 1.0 litre

L'Agar 15 g

Le pH est ajusté à 6.8. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

Titre :

Évaluation de l'efficacité symbiotique de quatre souches de *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* nodulant le pois *Pisum sativum*.

Résumé :

Ce travail a été réalisé afin d'étudier l'effet d'inoculation de quatre souches de *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* isolées à partir de nodosités racinaires du pois et de la lentille sur la croissance du pois fourrager. La croissance des plantes a été faite en pots sur sable stérile. L'évaluation de l'infectivité et de l'efficacité des rhizobia était déterminée par analyse de la croissance des plantes en mesurant le poids de la matière sèche des parties aériennes, des racines, et des nodules ainsi que le nombre des nodules. L'effet souche sur le nombre et la biomasse de nodules a révélé que la souche HL1 est la plus infectieuse, alors que TP4 est la moins infectieuse. Cependant, l'efficacité la plus élevée est celle enregistrée par la souche TP4 qui se classe dans le même groupe que le témoin azoté. La plante d'origine n'a montré aucun effet sur l'efficacité symbiotique. Une seule corrélation positive a été observée entre la matière sèche et le nombre de nodules.

Mots clés : Pois fourrager, lentille, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, symbiose, efficacité, infectivité.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Ecologie microbienne. Département de Microbiologie et de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie .U.F.M.Constantine

Jureys d'évaluation :

Président : BENGUEDOUAR AMMAR
Rapporteur : RIAH NASSIRA.
Examineur : BENHIZIYA YACINE

U. F.Mentouri- Constantine
U.F. Mentouri- Constantine
U.F. Mentouri- Constantine