



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département: Microbiologie

قسم : الميكربولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

**Mise en évidence des Rhizobia chez la légumineuse
Pisum sativum L. poussant dans différents écosystèmes
Algériens**

Présenté et soutenu par : **Nair Imen**

Le : 15/06/2015

Bendaira Sara

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Alatou Radia (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Rapporteur : Mlle Gaci Meriem (Maitre-assistante « A »- UFM Constantine).

Examineurs : Mme Riah Nassira (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

REMERCIEMENTS

Louange à Dieu jusqu'à ce qu'il atteigne sa limite Louange, nos Remerciements sont d'abord au «**Dieu** », qui nous a amené à ce niveau et qui nous a donné la force pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier infiniment **Mlle Gaci Meriem**, Maitre Assistante à l'Université des Frères Mentouri-Constantine pour son aide tout au long de notre période de travail, nous n'oublions pas ses efforts et ses critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique. Nous vous remercions pour votre soutien, Merci madame.

Nous remercions **Mr Benguedouar Ammar**, Professeur à l'Université des Frères Mentouri-Constantine, pour nous avoir accepté dans le laboratoire Ecologie Microbienne.

Nous remercions sincèrement **Mme Alatou Radia** Maitre de Conférences à l'Université des Frères Mentouri-Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions également **Mme Riah Nassira** Maitre de Conférences à l'Université des Frères Mentouri- Constantine, d'avoir accepté d'examiner et juger notre travail.

Et sans oublier tous les membres du laboratoire Ecologie microbienne et à tous ceux qui ont participé pour l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils
trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude
pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout
au long de mes études, que DIEU les bénisse.*

*A mes chères sœurs Khadîdja, Meriem, Chahinez, et surtout Halima
et mon cher frère Ayoub vous êtes les meilleurs qui
existe, je te souhaite un avenir plein de joie, de
réussite et de bonheur.*

A toutes mes amies

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime spécialement Khaled

IMEN

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu à mes parents, qui ont toujours été présents à mes cotés pour me soutenir et m'encourage. Je ne saurai jamais vous remercier pour la patience dont vous faites preuve ni pour le réconfort que je trouve auprès de vous. Je n'aurais sûrement pas réalisé tout ce chemin sans votre aide constante.

Je le dédie à ma sœur Aya et mes frères: Ramzi, Amer, et Abderrahmane

Une énorme dédicace à mon grand-père

A toutes les personnes et mes amies qui m'ont aidé, soutenu et encouragé, je vous remercie.

Enfin, je réserve une pensée particulière à toutes les personnes qui ont prié pour moi sans que je le sache.

SARA

Résumé

Le Bassin Méditerranéen est le berceau de diversification d'un grand nombre d'espèces végétales d'intérêt fourrager et/ou pastoral.

Parmi de nombreuses légumineuses, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à étudier la biodiversité des bactéries nodulant le pois fourrager. 10 isolats isolés à partir des nodules de la plante sont caractérisés par une étude phénotypique. Les résultats sont comparés à ceux de la souche témoin *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* OL13.

La croissance sur les milieux de cultures YMA+RC et GPA+BCP, les tests biochimiques ainsi que la tolérance à la température montrent une diversité entre les isolats.

Le test de nodulation a été effectué pour mettre en évidence l'aptitude des isolats à noduler les racines de la plante *Pisum sativum* L., les résultats ont confirmé que ce sont tous les microsymbiontes de la plante hôte.

Mots clés: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, les nodules racinaires, B.N.L, symbiose.

Summary

The Mediterranean Basin is the birthplace of diversification of a large number of plant species of forage interest and / or pastoral.

Among many legumes, we were interested in this work to study the biodiversity of bacteria nodulating forage peas. 10 isolates isolated from nodules of the plant are characterized by a phenotypic study. The results are compared to those of the control strain *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. OL13.

The growth on YMA culture media and GPA + CR + BCP, biochemical tests and the temperature tolerance show diversity between isolates.

The nodulation test was conducted to demonstrate the ability of the isolates nodulated the roots of the plant *Pisum sativum* L., the results confirmed that these are all the host plant microsymbiont.

Keywords: *Pisum sativum* L, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, root nodules, B.N.L, symbiosis.

ملخص

يعتبر حوض البحر الأبيض المتوسط مسقط رأس عدد كبير من أنواع النباتات ذات الأهمية الرعوية.

من بين العديد من البقوليات، اهتمنا بدراسة التنوع البيولوجي لبكتيريا معزولة من عقيدات البازلاء العلفية.

تمت دراسة التنوع المظهري على 10 عزلات منها. و النتائج المتحصل عليها قورنت مع السلالة الشاهد

leguminosarum bv. viciae OL13

تظهر الاختبارات التي انجزناها من بينها النمو على YMA+BTB, GPA+BCP, اختبارات الكيمياء الحيوية

إضافة إلى تحمل درجات الحرارة, إلى وجود تنوع بين السلالات

تم إجراء اختبار التعايش و ذلك من خلال تسليط الضوء على قدرة العزلات بتشكيل عقد جذرية لنبات البازلاء

Pisum Sativum L. حيث أكدت النتائج على هذه العلاقة التكافلية و على خصوصيتها .

الكلمات المفتاحية

Rhizobium leguminisarum bv. *viciae*, *Pisum sativum* L, العقد الجذرية, البكتريا المشكلة

عقيدات للبقوليات التعايش

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 Etude Bibliographique	
1. La fixation biologique de l'azote.....	2
1.1. Les fixateurs symbiotiques.....	2
1.2. Les fixateurs libres.....	3
2. La symbiose <i>Rhizobium-Légumineuse</i>	3
2.1. Le partenaire végétal: <i>les légumineuses</i>	3
2.1.1. <i>Les Mimosoideae</i>	4
2.1.2. <i>Les Caesalpinioideae</i>	4
2.1.3. <i>Les Papilionoideae</i>	4
<i>Pisum sativum L.</i>	4
2.2. Le partenaire bactérien.....	6
2.2.1. Taxonomie des BNL	7
2.3. Spécificité de la symbiose.....	9
2.4. Les bases moléculaires de la symbiose.....	10
2.4.1. Les flavonoïdes.....	10
2.4.2. Les facteurs NOD	10
2.4.3. Les gènes <i>nif</i> et <i>fix</i>	11
2.5. La biochimie de la fixation	11
2.5.1. La nitrogénase.....	11
2.5.2. La leghémoglobine	11
2.6. La nodulation	12

Chapitre 2 Matériel et Méthodes

1. Le matériel biologique utilisé	14
2. Vérification de la pureté des isolats.....	14
3. Conservation des isolats.....	14
4. Caractérisation phénotypique des isolats.....	14
4.1. Croissance sur les différents milieux de cultures.....	14
4.2. Vitesse de croissance.....	14
4.3. Tests biochimiques.....	15
4.3.1. Réduction des nitrates.....	15
4.3.2. Hydrolyse de l'urée.....	15
4.3.3. Activité cellulolytique.....	15
4.4. Effet de la température.....	16
5. Test de nodulation	16
5.1. Désinfection et germination des graines.....	16
5.2. Préparation des flacons.....	17
5.3. Dénombrement des nodules.....	17
5.4. Conservation des nodules.....	17
5.5. Ré-isolément des bactéries à partir des nodules.....	18
5.5.1. Stérilisation des nodules.....	18
5.5.2. Isolement des bactéries	18

Chapitre 3: Résultats et discussion

1. Vérification de la pureté des isolats	19
2. Caractérisation phénotypique des isolats.....	20
2.1. Croissance sur les différents milieux de cultures.....	20
2.1.1. Aspect des colonies sur le milieu YMA additionné de rouge Congo.....	20
2.1.2. Aspect des colonies sur le milieu GPA additionné de BCP.....	20
2.2. Vitesse de croissance.....	21
2.3. Tests biochimiques.....	22
2.3.1. Réduction des nitrates.....	22
2.3.2. Hydrolyse de l'urée.....	23
2.3.3. Activité cellulolytique.....	24
2.4. Effet de la température.....	25
3. Test de nodulation.....	28
Conclusion	32
Références bibliographiques.....	33

Annexes

Liste des illustrations

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des BNL	7
Tableau 2. Les isolats utilisés dans cette étude.....	19
Tableau 3. Croissance des isolats et la souche témoin à différentes températures.....	26
Tableau 4. Nombre et caractéristiques des nodules produits sur chaque plante.....	29

Liste des figures

Figure 1. La plante du pois fourrager	5
Figure 2. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-legumineuse.....	13
Figure 3. Conservation des nodules	18
Figure 4. Croissance des bactéries sur le milieu GPA+BCP.....	20
Figure 5. Croissance des bactéries sur le milieu YMA+BTB.....	21
Figure 6. Réduction des nitrates.....	22
Figure 7. Hydrolyse de l'urée.....	24
Figure 8. Activité cellulolytique.....	25
Figure 9. Croissance des isolats à quelques températures.....	27
Figure 10. Croissance des plantes dans la chambre de culture.....	28
Figure 11. Disposition des nodules sur les racines du pois fourrager	30
Figure 12. Racines nodulées par quelques isolats.....	31
Figure 13. Racines nodulées par la souche de référence OL13.....	31

Introduction

L'azote, en tant que composant omniprésent dans les biomolécules (protéines, acides nucléiques, vitamines...), est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Malheureusement, la concentration de ses formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, etc.) est souvent limitante pour la bonne croissance des plantes et constitue de ce fait, très fréquemment, le facteur clé de la production agricole (Roger, 1996).

Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries *Rhizobiums* du sol. Elles développent des nodules sur leurs racines, dans lesquelles les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante. Cette symbiose présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés.

Dans les pays méditerranéens, les légumineuses occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elles constituent une source d'alimentation pour l'homme (légumineuses à graines, pois chiche, haricot, lentille...) et fourragère pour les animaux (luzernes, trèfles, Sulla...).

Notre mémoire propose d'étudier certains caractères morphologique et cultural des isolats suivie d'une caractérisation symbiotique et phénotypique des bactéries nodulant le pois fourrager isolées par piégeage à partir du sol rhizosphérique de la plante hôte.

Ce document qui présente les résultats de cette étude, s'articule autour de deux parties. La première fait une synthèse bibliographique sur la fixation d'azote, le pois fourrager, les *rhizobia* et le processus de nodulation. Quant à la seconde, elle concerne l'étude expérimentale qui décrit les manipulations au laboratoire, le matériel et les méthodes utilisés et enfin, présente les résultats qui feront l'objet d'une discussion.

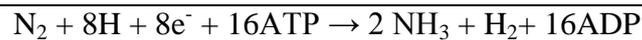
Chapitre 1

Etude bibliographique

1. La fixation biologique de l'azote

L'atmosphère contient une grande quantité de diazote (78% en volume) (Newton, 1998), mais cet azote gazeux est très peu bio-disponible pour la plupart des espèces. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries, dites *diazotrophes*, qui possèdent le complexe enzymatique réducteur appelé *nitrogénase* capable de casser la triple liaison N-N. (Day et *al.*, 2001; Downie, 2005).

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH₃). Dans le système biologique fixateur de N₂ les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères (pression de 250-1.000 atm de N₂ et température de 450°C) (Hopkins, 2003).



1.1. Les fixateurs symbiotiques

Directement via la plante dans le cas d'associations plantes-microorganismes. C'est le système associant des plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries à Gram négatif, communément et collectivement appelées les *Rhizobia* ou bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) et d'*Actinomycètes* du genre *Frankia* (bactérie à Gram positif, filamenteuses et sporulantes) qui nodulent des plantes ligneuses appartenant à différentes familles de *dicotylédones*, dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* (Benson et Silvester, 1999). Une symbiose particulièrement concerne la cyanobactérie *Anabaena* associée à la fougère aquatique *Azolla*, qui est utilisée comme engrais vert dans les rizières (Franche et *al.*, 2009).

1.2. Les fixateurs libres

Les fixateurs libres sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique, ils comprennent des genres très divers :

- des bactéries aérobies chimio-organotrophe (*Acetobacter*, *Azobacter*, *Azospirillum*,) (Gillis et al., 1989 ; Becking, 2006; Steenhoudt et Vanderleyden, 2000), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) (Asami et Kiwamu, 2006) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) (Chelius et Triplett, 2000; Yan et al., 2008), des bactéries phototrophes (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) (Masepohl et al., 2005) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Meeks et Elhai, 2002).

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).

2. La symbiose *Rhizobium-legumineuse*

Les bactéries de la famille des *Rhizobiacées* en général peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation d'un organe spécialisé, le nodule, et offre un micro-habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse qui fournit à la plante hôte l'azote de sous forme assimilable NH₃ (Dommergues et al., 1999). On a donc bien une symbiose, c'est à-dire une association à bénéfice réciproque. Cependant, la réduction de l'azote atmosphérique est un processus très coûteux en énergie (Smil, 2002).

2.1. Le partenaire végétal: les *legumineuses*

Les *legumineuses* sont des végétaux supérieurs qui appartiennent à la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), de l'ordre des *Fabales* et se divisent en trois sous-familles: les *Cesalpinoideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionideae*. Très peu d'espèces chez les *Cesalpinoideae* sont nodulées, alors que la plupart des espèces de *Papilionideae* d'intérêt agronomique le sont (soja, luzerne, pois, haricots, Arachide...) (Doyle, 2011).

2.1.1. Les *Mimosoideae*

Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (*Glycine*, *Acacia*...). Elles sont en majorité des arbres et arbustes des régions tropicales et subtropicales (Maxted et Bennett, 2001a).

2.1.2. Les *Caesalpinioideae*

Comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23% seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les *Rhizobia*. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des *Caesalpinieae* et *Cassiee*; les tribus *Cercideae* et *Amherstieae* étant très peu nodulées (Maxted et Bennett, 2001b).

2.1.3. Les *Papilionoideae*

Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995 rédigés par Ziada et Bellir, 2014). Les *Papilionoideae* sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisum sativum* L.) et le 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.) (FAO, 1996).

***Pisum sativum* L.**

Le pois, *Pisum sativum* L. est une espèce du genre *Pisum* de la sous famille *Papilionoideae*. Ce genre 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 rosâtres 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, ne renferment que quelques grains; se terminent en bec, polyspermes (Quezel et Santa, 1962)

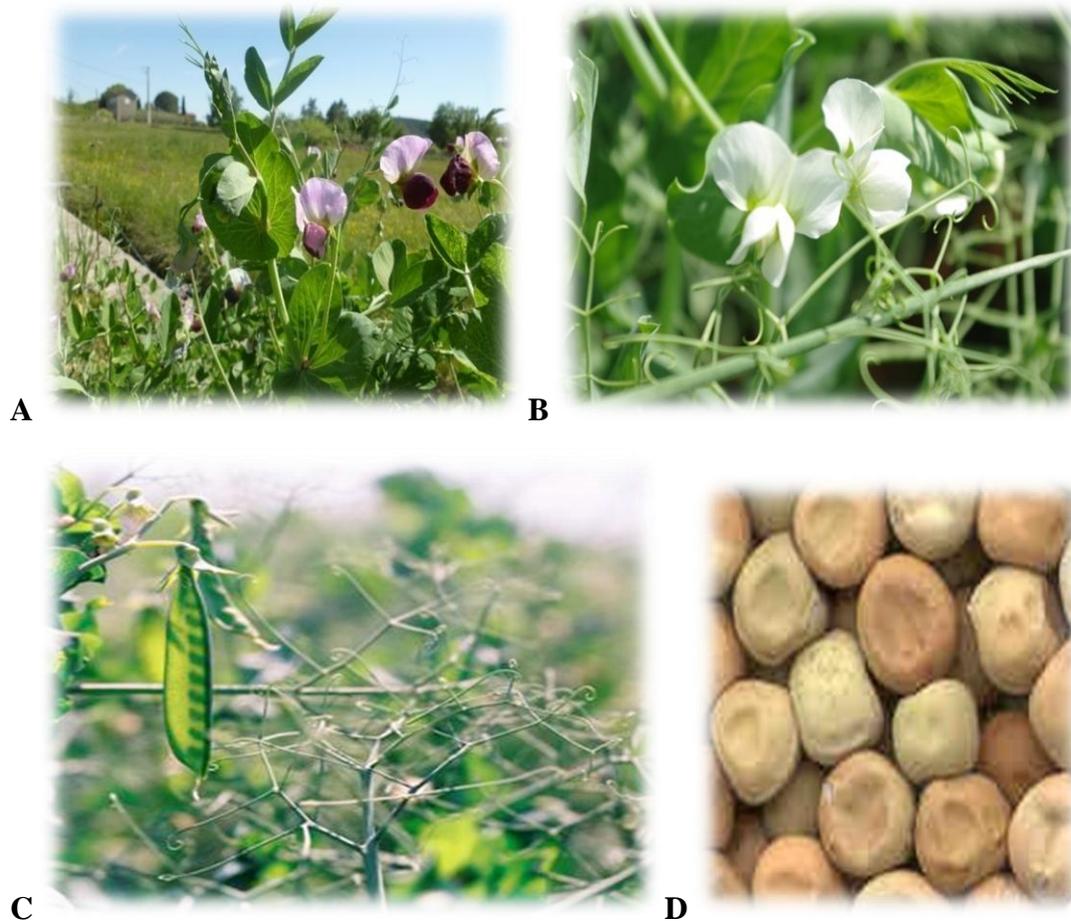


Figure 1. La plante du pois fourrager

(A) Pois fourragers (B) Pois protéagineux

(c) la gousse du pois (d) les graines du pois protéagineux

Les pois fourragers sont les pois destinés à l'alimentation animale, sous forme de fourrage ou de grains secs. Il s'agit le plus souvent de variétés à fleurs pourpres et à grains gris (Figure 1).

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) :

- Le pois frais (85% d'eau): les graines sont récoltées au stade avant maturité, on obtient les petits pois verts de maraîchage classés comme légume frais.
- Le pois sec (15% d'eau): les graines sont récoltées à maturité au stade sec, soit le pois cassé classé comme un légume sec, soit le pois protéagineux destiné à l'alimentation animale.
- Les jeunes pousses feuillées sont aussi consommées en légume, particulièrement en Asie.

• La plante entière fournit un fourrage aux ruminants, soit en sec, soit en vert, frais ou ensilé. On utilise aussi à cet effet la paille, c'est-à-dire les fanes restant sur le terrain après la récolte des gousses ou des graines. En général, on appelle pois fourrager tout type de pois destiné à l'alimentation animale, y compris les pois secs en grains qui sont appelés pois protéagineux. Le pois est aussi une plante importante dans une rotation, car il fixe l'azote atmosphérique et joue ainsi un rôle dans le rétablissement de la fertilité du sol (Brink et Belay, 2006).

2.2. Le partenaire bactérien

Le terme *Rhizobium* a été utilisé en premier pour désigner ces bactéries formant des Nodules sur les légumineuses. Dugrec, «*Rhizo*»=racineet «*bium*»=vivant. Dénommé Ainsi par Franck car ce microorganisme vit dans les racines (Frank, 1889).

D'un point de vue morphologique et microscopique les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) se présentent sous forme de bâtonnets à Gram négatif, aérobies, mobiles (grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches) (Werner, 1992), avec des dimensions approximatives de 0.5 à 0.8 μm de largeur et 1.3 à 3.0 μm de longueur. Ils se développent facilement dans un milieu de culture proche de la neutralité avec une source de carbone et une source d'azote, à une température optimale de croissance de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, ils sont non sporulant dont la vitesse de croissance sur le milieu YMA est variable (Vincent, 1970). Ainsi, Jordan en 1984 attribue le nom de *Bradyrhizobium*aux souches qui ont une croissance lente.

Du point de vue phylogénétique, elles font partie de la sous-classe α ou β des *protéobactéries* (Moulin et al., 2001; Chen et al., 2001) ainsi que certaines *γ -protéobactéries* (Benhizia et al., 2004).

Somasegaran et Hoben (1994) ont indiqué que les BNL se trouvent sous deux formes :

- **une forme végétative** (non bactéroïde): ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes.

- **une forme bactéroïde**: chez les groupes *Rhizobium leguminosarum* bv *trifoli*, *Ensifer meliloti* (anciennement *Rhizobium meliloti*), les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près 10 fois plus grande que ceux de la forme végétative. Par contre il n'existe pas

de différence de taille entre les deux formes régulières chez le *Rhizobium* des groupes *Vigna* et *Lotus*.

2.2.1. Taxonomie des BNL

La classification des rhizobiums a été passée par un changement substantiel au cours des dernières années grâce à l'ajout de plusieurs nouveaux genres et espèces de ce groupe de bactéries importantes. Des études récentes ont montré l'existence d'une grande diversité parmi les bactéries fixatrices d'azote isolées à partir de différentes légumineuses (Tableau 1).

Tableau 1. Classification des BNL selon Berrada et Benbrahim (2014).

	Source d'isolement	Référence
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i> Genre: <i>Rhizobium</i>		
<i>R. leguminosarum</i> <i>symbiovarviciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>	Frank et al., 1889 Frank et al., 1889; Jordan et al., 1982 Jordan et al., 1982; Renan et al., 2012
<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank et al., 1889; Jordan et al., 1982 Terefework et al., 1998; Lindström et al., 1989
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>	Lindström et al., 1989
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>	Martinez et al., 1991 Renan et al., 2012
<i>Symbiovar officinalis</i> <i>Symbiovar orientalis</i> <i>R. tropici</i>	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i> <i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>	Martinez et al., 1991 López et al., 2010
<i>R. leucaenae</i> <i>R. tropici</i> <i>R. endophyticum</i> <i>R. phaseoli</i> <i>R. fabae</i> <i>R. etli</i> <i>Symbiovar mimosae</i> <i>Symbiovar phaseoli</i> <i>R. undicola</i> <i>R. gallicum</i> <i>Symbiovar phaseoli</i> <i>Symbiovar gallicum</i> <i>R. giardinii</i> <i>Symbiova rphaseoli</i> <i>Symbiovar giardinii</i> <i>R. hainanensis</i> <i>R. huautlense</i> <i>R. mongolense</i> <i>R. yanglingense</i> <i>R. larrymoorei</i> <i>R. indigoferae</i> <i>R. sullae</i> <i>R. loessense</i> <i>R. cellulosityticum</i> <i>R. miluonense</i> <i>R. multihospitium</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. pisi</i> <i>R. mesosinicum</i> <i>R. alamii</i> <i>R. alkalisoli</i> <i>R. tibeticum</i> <i>R. tubonense</i> <i>R. halophytocola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Viciafabae</i> <i>Phaseolus,</i> <i>Mimosa affinis</i> <i>Phaseolus</i> <i>Neptunia natans</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Desmodium sinuatum, Centrosema</i> <i>Sesbania herbacea</i> <i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i> <i>Amphicarpaea</i> <i>Ficus benjamina</i> <i>Indigofera spp.</i> <i>Hedysarum</i> <i>Astragalus, Lespedeza</i> <i>Populus alba</i> <i>Lespedeza</i> <i>Multiple legume species</i> <i>Oryza alta</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Caragana intermedia</i> <i>Trigonella archiducis-nicolai</i> <i>Oxytropis glabra</i> <i>Coastal dune plant</i>	Tian et al., 2008 Segovia et al., 1993 Wang et al., 1999 Souza et al., 1994 de Lajudie et al., 1998 Amarger et al., 1997 Chen et al., 1988 Wang et al., 1998 Van et al., 1998 Tan et al., 2001 Bouzar et al., 2001 Wei et al., 2002 Squartini et al., 2002 Wei et al., 2003 Garcia et al., 2007 Gu et al., 2008 Han et al., 2008 Peng et al., 2008 Ramirez et al., 2008 Lin et al., 2008 Berge et al., 2009 Lu et al., 2009 Hou et al., 2009 El Akhal et al., 2008 Hou et al., 2009 Young et al., 2001 Pulawska et al., 2012

<i>R. radiobacter</i>	*	Dangeard, 1926
<i>R. rhizogenes</i>	*	Scholla et Elkan, 1984
<i>R. rubi</i>	*	Chen et al., 1988
<i>R. vitis</i>	*	de Lajudie et al., 1994
<i>R. nepotum</i>	*	
Genre: Ensifer		Young et al., 2001
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Lorquin et al., 1997
<i>E. fredii</i>		Rome et al., 1996
<i>Symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>	Nick et al., 1999
<i>Symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>	
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>	Chen, Yan, Li, 1988
<i>E. teranga</i>	<i>Different host plants</i>	Casida, 1982
<i>Symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>	
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>	Wei et al., 2002
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>	
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Toledo et al., 2003
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Lloret et al., 2007
<i>E. xingianense (Formerly: Simorhizobium xingianense)</i>	<i>Glycine max</i>	Merabet et al., 2010
<i>E. adhaerens</i>	*	Lin et al., 2008
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>	Jarvis et al., 1982
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Chen et al., 1991
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	
<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>	
Genre: Shinella		Nour et al., 1994
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Jarvis et al., 1997
Famille: Phyllobacteriaceae		Nour et al., 1995
Genre: Mesorhizobium		de Lajudie et al., 1998
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus...</i>	Wang et al., 1999
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Velásquez et al., 2001
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Gao et al., 2004
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis.</i>	Wang et al., 2007
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Guan et al., 2008
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	
<i>M. thioangeticum</i>	*	
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Nandasena et al., 2009
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	Vidal et al., 2009
<i>M. gobiense</i>	<i>Wild legumes</i>	Chen et al., 2011
<i>M. tarimense</i>	<i>Wild legumes</i>	Degefu et al., 2013
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	Zhang et al., 2012
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	Degefu et al., 2013
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>	Zheng et al., 2013
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>	Zhou et al., 2010
<i>M. abyssinicae</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Chen et al., 1991
<i>M. muleiense</i>	<i>Cicerarietinum</i>	Lu et al., 2009
<i>M. hawassense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Zhao et al., 2012
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Ramirez et al., 2012
<i>M. shonense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana species</i>	
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus species</i>	Valverde et al., 2005
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>	
Genre: Phyllobacterium		
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	
Famille: Methylobacteriaceae		
Genre: Methylobacterium		
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>	Jourand et al., 2004
Genre: Microvirga		Ardley et al., 2012
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus sp.</i>	Zurdo et al., 2007
<i>M. lotononidis</i>	<i>Different legume host</i>	Trujillo et al., 2005
<i>M. zambiensis</i>	<i>Different legume host</i>	Dreyfus et al., 1988
Famille: Brucellaceae		Moreira et al., 2006
Genre: Ochrobactrum		Lang et al., 2013
<i>Ochrobactrumcytisi</i>	<i>Cytisus</i>	Rivas et al., 2003
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	Jordan 1984 ; Jordan et al., 1982
Famille: Hyphomicrobiaceae		KuyKendall et al., 1992
Genre: Azorhizobium		
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	
<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	

<i>A. oxalatophilum</i> Genre: <i>Devosia</i> <i>Devosianeptunia</i> Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i> Genre: <i>Bradyrhizobium</i> <i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> <i>B. iriomotense</i> <i>B. jicamae</i> <i>B. lablabi</i> <i>B. huanghuaihaiense</i> <i>B. cytisi</i> <i>B. daqingense</i> <i>B. denitrificans</i> <i>B. oligotrophicum</i> <i>B. pachyrhizi</i> Classe: <i>Beta Proeobacteria</i> Ordere: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i> Genre: <i>Burkholderia</i> <i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. nodosa</i> <i>B. sabiae</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. rhizoxinica</i> <i>B. diazotrophica</i> <i>B. endofungorum</i> <i>B. heleaia</i> <i>B. symbiotica</i> Genre: <i>Cupriavidus</i> <i>C. taiwanensis</i> Classe: <i>Gamma-Proteobacter</i> Ordere: <i>Pseudomonadales</i> Famille: <i>Pseudomonaceae</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Neptunia natans</i> <i>Glycine max, Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Lespedeza</i> <i>Betae vulgaris</i> <i>Genisteeae et Loteae</i> <i>Entada koshunensis</i> <i>Pachyrhizus erosus</i> <i>Lablab purpureus</i> <i>Glycine max</i> <i>Cytisus villosus</i> <i>Glycine max</i> <i>Aeschynomene</i> <i>Pachyrhizus erosus</i> <i>Vertisol microaggregates</i> <i>Alysicarpus glumaceus</i> <i>Aspalatus carnosus</i> <i>Machaerium lunatum</i> <i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i> <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Eleocharis dulcis</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Aspalatus carnosus</i> <i>Mimosa sp.</i> <i>Robinia pseudoacacia</i>	Xu et al 1995 Yao et al., 2002 Rivas et al., 2004 Vinuesa et al., 2005 Islam et al., 2008 Ramirez et al., 2009 Islam et al., 2008 Zhang et al., 2012 Chahbourne et al., 2011 Wang et al., 2013 Van et al., 2006 Ramirez et al., 2013 Van, Eardly 2002 Achouak et al., 1999 Moulin et al., 2001 Vandamme et al., 2003 Chen et al., 2007 Chen et al., 2008 Chen et al., 2003 Partida et al., 2007 Sheu et al., 2013 Partida et al., 2007 Aizawa et al., 2010 SHEU et al., 2012 Vandamme, Coeyene, 2004 Shiraishiet al., 2010
---	--	---

* Espèces ne parviennent pas à noduler incluses traditionnellement dans les rhizobiums.

2.3. Spécificité de la symbiose

L'une des propriétés majeures de la symbiose *Rhizobium-legumineuse* est sa spécificité. En général, chaque légumineuse ne peut être infectée que par une ou quelques espèces de *Rhizobium* et réciproquement, chaque souche de *rhizobiums* ne peut infecter qu'un nombre limité d'espèces de légumineuses.

En effet, on retrouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que: *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988), alors que cette même légumineuse possède d'autres partenaires bactérien (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*.) (Boivin et al., 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec les espèces des genres *Medicago*, *Melilotiet Trigonella* (De Lajudie et al., 1994).

2.4. Les bases moléculaires de la symbiose

La formation des nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante (Michelle et Lindeque, 2006). Plusieurs groupes de gènes du microsymbiote et de la plante hôte contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote (Franssen et al., 1992).

2.4.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes se sont des substances chimiques qui se trouvent chez les végétaux, ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les *rhizobiums*. Ces exsudats qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, qui en retour relâche des lipopolysaccharides (LPS) provenant de sa membrane (Taylor et Grotewold, 2005).

Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes (Perret et al., 2000), qui stimulent la nodulation mais chez certaines espèces inhibent en fait le processus (Hopkins, 2003). Ces composés phénoliques sont inducteurs des gènes *nod*, mais avec des efficacités variables selon leur concentration et leur structure chimique, en particulier les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses (Brencic et Winans, 2005).

2.4.2. Les facteurs Nod

Après avoir colonisé la rhizosphère, les *Rhizobiums* commencent à synthétiser des signaux moléculaires morphogènes appelés facteurs de nodulation ou facteurs Nod (Dénarié et Cullimore, 1993). Les facteurs Nod sont des dérivés, un polymère de N-acétyl-D-glucosamine avec des liaisons β (1-4), présent dans les parois des champignons et dans l'exosquelette des insectes (Spaink et al, 1992).

Dans les premiers stades de nodulation, avant l'infection de la racine, un groupe de gènes de rhizobium, les gènes *nod* sont activés par les flavonoïdes; des exsudats racinaires émis par l'hôte; les gènes *nod* sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire (plasmide) du rhizobium appelée plasmide *Sym* (pour symbiose). Trois gènes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC*) sont des gènes de nodulation communs à tous les *Rhizobiums*; ils codent pour le squelette chimio-oligosaccharidique des facteurs Nod (Werner, 1992).

2.4.3. Les gènes *nif* et *fix*

La synthèse du complexe enzymatique la di-nitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif*. Deux gènes *nif* : *nifD* et *nifK*, codent respectivement pour les deux sous-unités de la protéine MoFe, la protéine Fe et la ferrédoxine sont codées respectivement par les gènes *nifH* et *nifF* (Fisher, 1994; Newton, 2007).

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques. L'un d'eux au moins (*fixX*), code pour une ferrédoxine; d'autres pourraient être impliqués dans le transport des éléments vers la di-nitrogénase (Triplett, 1996).

2.5. La biochimie de la fixation

2.5.1. La nitrogénase

La conversion biologique de l'azote moléculaire en ammonium est catalysée par une enzyme, la *nitrogénase*, système que l'on trouve chez les bactéries fixatrices d'azote (Rees et al., 1993).

Le complexe nitrogénase, qui réalise cette transformation fondamentale, est constitué de deux protéines:

1) Une *dinitrogénase* réductase: (la *nitrogénase I*) la *Fe-protéine* qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc et al., 1995 ; Hopkins, 2003).

2) Une *nitrogénase*: appelée aussi *molybdoprotéine MoFe protéine* c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramérique) $\alpha_2 \beta_2$ de 220 KDa, ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire N_2 en NH_3 (Leclerc et al., 1995 ; Hopkins, 2003). Le transfert des électrons de la réductase à la *nitrogénase* est couplé à l'hydrolyse de l'ATP par réduction.

2.5.2. La leghémoglobine

Le complexe nitrogénase est extrêmement sensible à l'inactivation par l' O_2 . La leghémoglobine abaisse considérablement la concentration d' O_2 libre dans les nodules de

la plante en le fixant ; l'O₂ fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber (Hopkins, 2003).

Bien que la plante synthétise le polypeptide de la leghémoglobine, le cofacteur constitué par l'hème est fourni par les bactéries elles-mêmes (la leghémoglobine est constituée de deux parties : un polypeptide et un hème (Hopkins, 2003).

2.6. La nodulation

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère par l'échange de signaux moléculaire entre la plante et la bactérie, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka *et al.*, 2002). Les *rhizobia* sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances de type flavonoïdes et iso-flavonoïdes, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape *et al.*, 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée. Ces flavonoïdes induisent l'expression des gènes *nod* bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod, des lipo-chito-oligosaccharides (LCO) (Perret *et al.*, 2000).

Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte; La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui renferme les *Rhizobium* (Wais *et al.*, 2002). Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules (Timmers *et al.*, 1999); plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Figure 2).

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Räzänen, 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité. L'infection de la plante par les *rhizobia* induit la différenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi., 2000). Les nodules de type indéterminé (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe (Mathesius *et al.*, 2000).

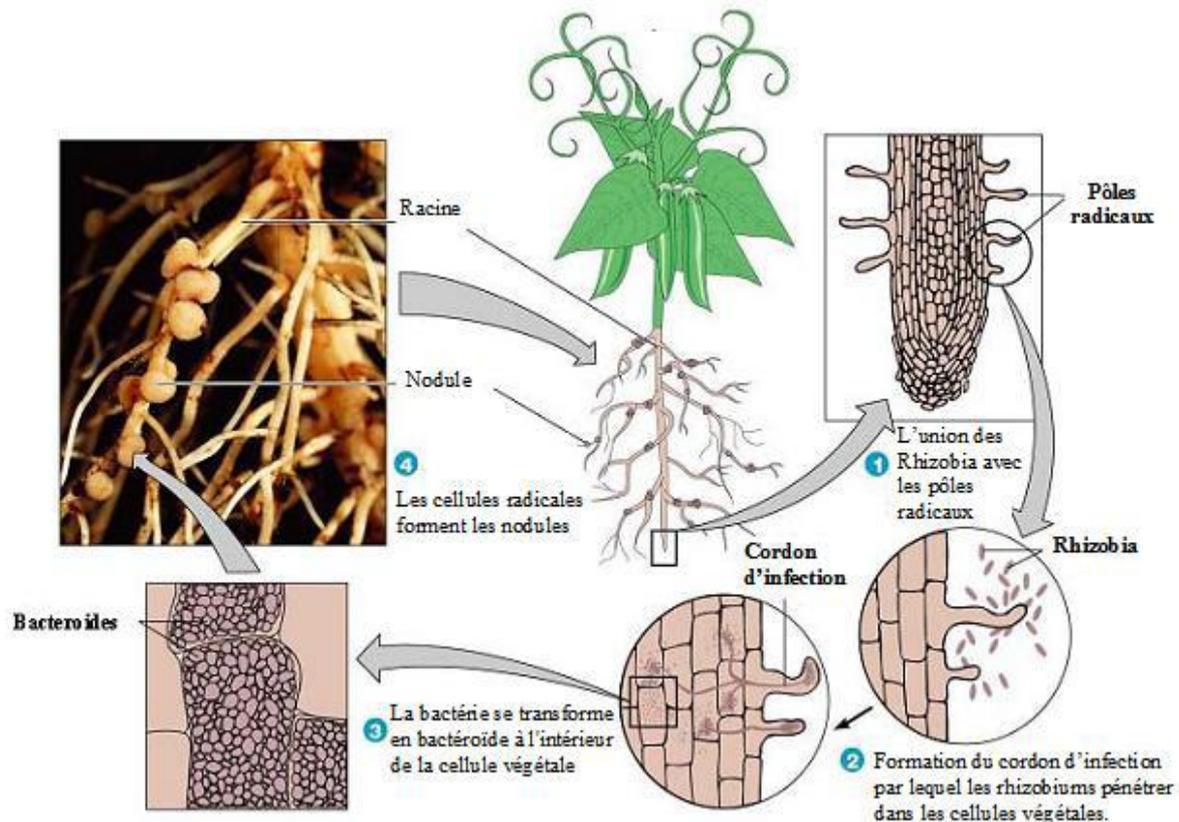


Figure 2. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose *rhizobia-legumineuse*.

(Rodriguez-Navarro et al., 2007)

La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà *des Rhizobia*. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée. Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers et al., 1999).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Le matériel biologique utilisé

Les 10 isolats utilisés dans notre travail ainsi que les graines du pois fourrager proviennent de la collection de notre rapporteur Mlle Gaci M.

2. Vérification de la pureté des isolats

Les souches bactériennes utilisées ont été l'objet d'un repiquage sur le milieu Yeast Mannitol Agar additionné de Rouge Congo (YMA+RC) (Annexe 1) et la coloration de Gram (Annexe 2) pour vérifier leur pureté.

3. Conservation des isolats

Après la vérification de leur pureté, les bactéries utilisées dans notre étude sont conservées sur des tubes inclinés et boîtes de Pétri (55mm Ø) contenant le milieu YMA additionné de CaCO₃ (1.5g/l). Après ensemencement et incubation à 28°C pendant 3 à 5 jours, les tubes et boîtes sont conservés à 4°C.

4. Caractérisation phénotypique des isolats

4.1. Croissance sur les différents milieux de cultures

La croissance des BNL dans les milieux YMA+RC et le Glucose Peptone Agar + pourpre de bromocresol (GPA+BCP) (Annexe 1) est un critère important dans leur caractérisation. Les bactéries ainsi que la souche de référence sont cultivées sur ces deux milieux de cultures et incubées à 28°C pendant 3jours.

4.2. Vitesse de croissance

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les *rhizobia*, présentent deux types de croissance: les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...) (Jordan, 1984). Pour cela nos isolats et souche de référence sont cultivés sur le milieu YMA + bleu de bromothymol (BTB) (Annexes 1). Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu qui fait virer sa couleur vers le bleu, alors que les bactéries à croissance rapide effectuent une réaction acide qui change la couleur verte du milieu en jaune (Somasegaran et Hoben, 1994).

4.3. 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 telle que la cellulase, et d'autres enzymes spécifiques nécessaires pour la croissance des BNL dans le sol comme la nitrate réductase et l'uréase.

4.3.1. Réduction des nitrates

Les isolats et la souche témoin sont cultivés sur le bouillon TY contenant 0.1% de KNO_3 (p/v), et incubés pendant 4 jours à 28°C avec agitation. Après la période d'incubation, 3 à 4 gouttes des réactifs I et II du nitrate réductase ont été ajoutés au milieu.

L'apparition d'une coloration rouge ou rose dans le milieu indique que les souches ont un nitrate réductase+ (les nitrates sont réduits en nitrites).

En absence de coloration, une pincée de la poudre de zinc est ajoutée au milieu. Si les nitrates sont toujours présents dans le milieu, ils vont être réduits sous l'effet du zinc et la coloration rouge apparaîtra, la réaction est donc réellement négative. Et si les nitrates ont été réduits par les souches en azote gazeux (N_2), le milieu ne contient plus les nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la couleur n'est pas modifiée (Euzéby, 2007; Delarras, 2007).

4.3.2. Hydrolyse de l'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 souches et la souche de référence sont cultivées sur le milieu YMA, contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012g/l de rouge de phénol (indicateur de pH). La solution d'urée est stérilisée par filtration ($\emptyset = 0.45\mu\text{m}$) et rajoutée au milieu maintenu à 45°C sous la hotte à flux laminaire. Après 48h d'incubation à 28°C, la réaction positive se manifeste par un virage de couleur au rose (rose fuchsia).

4.3.3. Activité cellulolytique

Pour détecter la présence d'une activité endoglucanasique chez les BNL, les isolats et la souche de référence sont mis en culture sur le milieu YMA contenant 0.25% de Carboxy-Methyl-Cellulose (CMC) pendant 5 jours à 28°C.

Après la période d'incubation 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. Si le fond de la boîte présente un halo jaune orangé entourant les colonies indique la présence de la cellulase (struffi et *al.*,1998).

4.4. Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés pendant 3 jours à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C et 50°C. L'incubation des boîtes à 4°C peut aller jusqu'à 10-20 jours.

5. Test de nodulation

Le but de ce test est d'identifier les souches et évaluer leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970, Beck et *al.*, 1993). Ce test consiste en l'inoculation des graines germé de la plante hôte (*Pisum sativum* L.) avec les différents isolats.

5.1. 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).

Dans un flacon stérile, les graines de la variété Séfrou sont immergées dans l'éthanol à 95° pendant 10 sec, ensuite il est remplacé par l'acide sulfurique concentré H₂SO₄ avec agitation manuelle pendant 3min pour induire la scarification. Après cette période, elles sont rincées à l'eau distillée stérile abondamment, ensuite elles sont laissées gonfler lors du dernier rinçage pendant 1heure.

Les graines stériles sont mises en germination sur boîtes de Pétri contenant le milieu Tryptone Yeast Agar (TYA) (Annexe 1) (Beringer, 1974) enveloppées avec du papier aluminium et incubées à température ambiante pendant 3 à 4 jours.

5.2. Préparation des flacons

Les graines germées ont été transférées dans des flacons remplis de solution nutritive de Fährus stérile additionnée de 1g/l de CaCO_3 (Annexe 1). L'orifice des flacons est fermée par un papier aluminium perforé par deux trous, l'un par lequel on introduit la radicule de la graine germée et l'autre permettant l'introduction de l'inoculum après l'apparition des premières feuilles de la plantule. L'inoculum bactérien liquide cultivé sur Yeast Mannitol Broth (YMB) (Annexe 1) a été transféré aseptiquement à raison de 1ml par graine dès l'apparition des racines latérales. Les flacons sont enveloppés par le papier aluminium pour éviter l'exposition des racines à la lumière. Les plantes ont été cultivées en chambre de culture (photopériode 24H/24) à raison de deux répétitions pour chaque isolat, Deux traitements non inoculés ont été inclus en tant que témoin négatif et deux témoins inoculés par la souche de référence ont été utilisés comme témoin positif.

5.3. Dénombrement des nodules

Après 4 semaines d'inoculation les nodules formés sont dénombrés leur taille et couleur ont été observées, la taille ainsi que le poids sec des parties aériennes sont mesurés.

5.4. Conservation des nodules

Les nodules formés sont rincés à l'eau puis séchés à l'aide d'un papier absorbant tout doucement pour ne pas les endommager ensuite ils sont détachés de la racine en coupant à quelques millimètres du site d'attachement.

Les nodules sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4° C jusqu'à 48h pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial: le Chlorure de Calcium anhydre (CaCl_2) (Vincent, 1970) (Figure 3). Les nodules issus du même isolat peuvent être conservés dans le même flacon sur lequel sont mentionnées le nom de l'isolat, le nom de la plante hôte et la date de conservation.

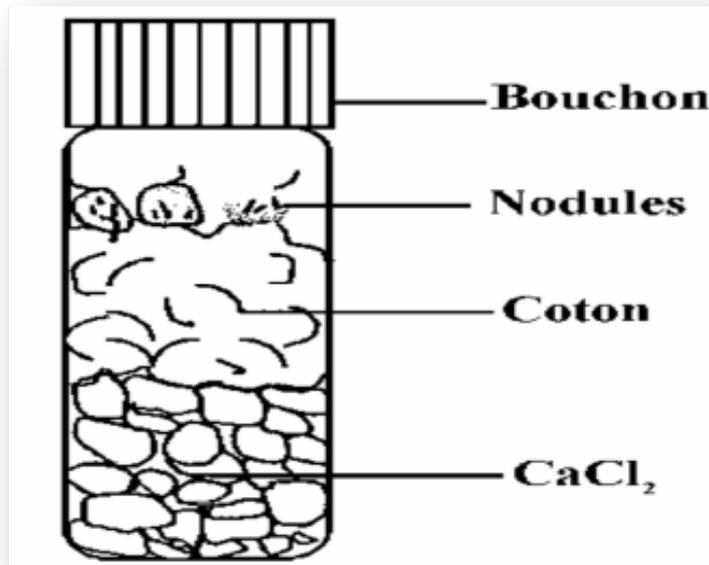


Figure 3. Conservation des nodules (Vincent, 1970)

5.5. Ré-isolement des bactéries à partir des nodules

5.5.1. Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessiccateur, ils seront réhydratés dans de l'eau distillée toute une nuit à 4°C, puis une heure à température ambiante. Si les nodules sont fraîchement collectés, ils vont être stérilisés et écrasés immédiatement.

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95° puis transférés dans une solution de d'hypochlorite de Calcium à 3% (p/v) pendant 3mn, ensuite rincés abondamment à l'eau distillée stérile.

5.5.2. Isolement des bactéries

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile ou dans un tube eppendorf stérile, l'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince stérilisée par flambage...).

A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus nodulaire est étalé sur le milieu YMA+RC. L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrants pour avoir des colonies bien isolées, les boîtes sont incubées de 48 à 72h à 28°C.

Chapitre 3

Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons travaillé avec 10 isolats isolés à partir des racines de la légumineuse *Pisum sativum* L. prélevée sur différents sites de l'Est et Centre Algérien, ces bactéries ont été comparé à une souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* OL13 (Tableau 2).

Tableau 2. Les bactéries utilisées dans cette étude

	Isolats et souche de référence	Origine	plante hôte	Source
Isolats	GP5N2	Guelma	<i>Pisum sativum</i> L.	Mlle Gaci M. U.F.M. Constantine
	GN1			
	CP17N2	Constantine		
	BOP20N3	Boumerdes		
	M1P39N1	Mila		
	M3P32N3			
	M3P32N4			
	M3P38N1			
	M3P38AN			
M3P42AN				
Souche de référence	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OL13	Oum El-bouaghi	<i>Lens culinaris</i>	Mme Riah N. U.F.M. Constantine

1. Vérification de la pureté des isolats

Les colonies apparaissent, sur le milieu YMA+RC, avec un aspect homogène en 48 à 72h d'incubation. La coloration de Gram a montré que tous les isolats et souche de référence sont des bâtonnets à Gram négatif.

2. Caractérisation phénotypique des isolats

Pour confirmer nos résultats, chaque test est réalisé trois fois.

2.1. Croissance sur les différents milieux de cultures

2.1.1. Aspect des colonies sur le milieu YMA additionné de rouge Congo

L'ensemencement des bactéries sur le milieu YMA+RC a donné des colonies qui absorbent peu le rouge Congo, elles sont de couleur rose claire ; translucides telles que GP5N2, BOP20N3, M3P32N3 et la souche témoin ou opaques telles que M1P39N1 et M3P32N4, de taille variable ayant une forme ronde bombée à bords réguliers et d'un aspect de surface lisse et brillant. Les colonies les plus visqueuses sont celles de M3P38AN et M3P42AN. La croissance est visible en 3 jours d'incubation. Ces résultats ont été observés chez la majorité des *Rhizobia* par Vincent (1970) et Jordan (1984).

2.1.2. Aspect des colonies sur le milieu GPA additionné de BCP

Après 72h d'incubation, on a observé une alcalinisation du milieu chez les isolats suivants: M3P42AN, M3P32N3, BOP20N3 et CP17N2 (photo.4B), une acidification chez: M1P39N1, GN1, GP5N2 (photo. 4A) alors que les isolas M3P38N1, M3P38AN, M3P32N4 ainsi que la souche de référence OL13 n'ont donné aucune croissance. Cette absence de croissance a été observée également chez les isolats de Riah (2001), isolés à partir des nodules du *Pisum arvense* L., et les isolats de Gaci (2010), isolés à partir des nodules issus du piégeage et des nodules issus de l'isolement direct de *Pisum sativum* L.

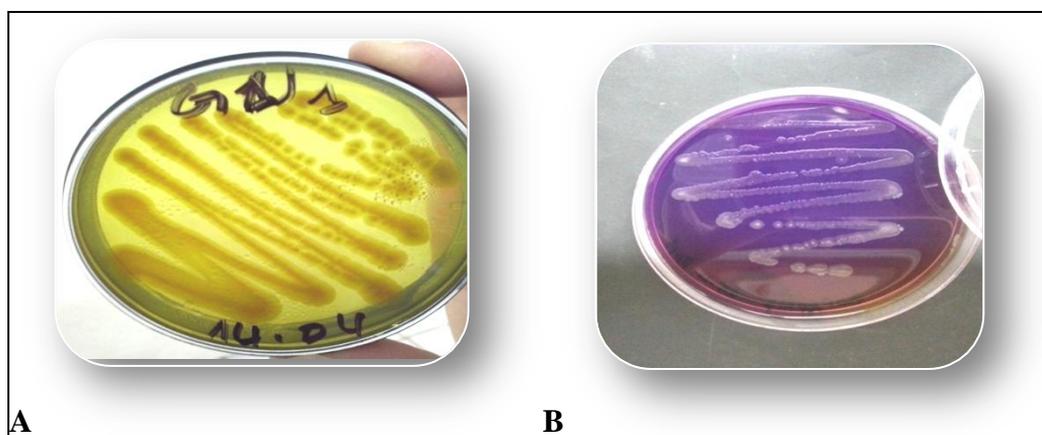


Figure 4. Croissance des bactéries sur le milieu GPA+BCP

A: Acidification du milieu **B:** Alcalinisation du milieu

2.1. Vitesse de croissance

Après 24 à 48h d'incubation; on note l'apparition des colonies avec virage du milieu vers le jaune, indiquant une production d'acide révélée par l'indicateur de pH chez les isolats: M3P32N3, GP5N2, M3P42AN, GN1, CP17N2, BOP20N3; aussi une acidification partielle est notée chez M1P39N1, M3P38AN, M3P38N1, M3P32N4 et la souche de référence, ce qui confirme que nos isolats sont à croissance rapide (Figure 5).

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes qui changent la coloration verte du milieu YMA+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).

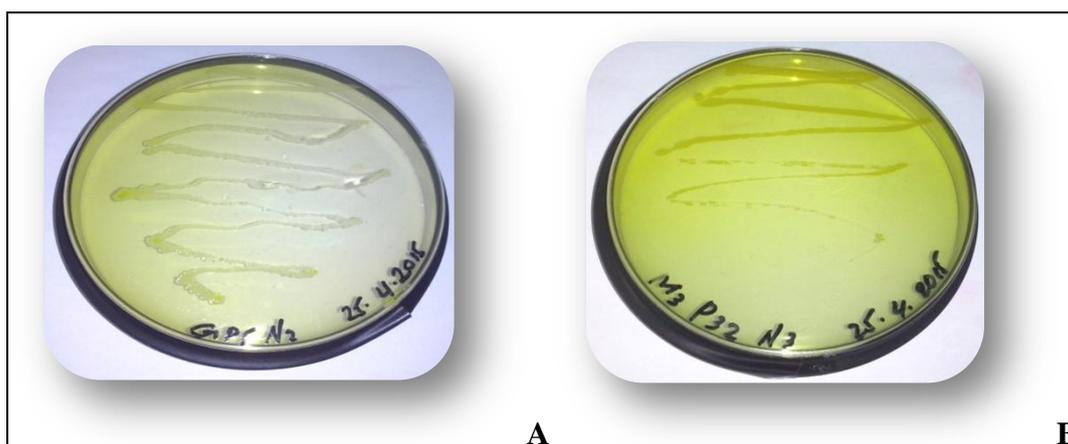


Figure 5. Croissance des bactéries sur le milieu YMA+BTB

A: Acidification du milieu **B:** Acidification partiel du milieu

2.3. Tests biochimiques

2.3.1. Réduction des nitrates

Après 4 jours d'incubation l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs 1 et 2 du nitrate réductase a montré un virage de la couleur du milieu au rose clair ou rouge chez tous les isolats et la souche de référence à l'exception de l'isolat CP17N2 le milieu est toujours inchangée. Après quelques minutes de l'ajout de la poudre de zinc, qui joue le même rôle que le nitrate réductase, n'a montré aucun virage de la couleur, donc le milieu ne contient plus les ions nitrates indiquant ainsi un résultat positif (Figure 6).

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 Leyval, 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.

La réduction des nitrates en nitrites utilisant un nitrate réductase :

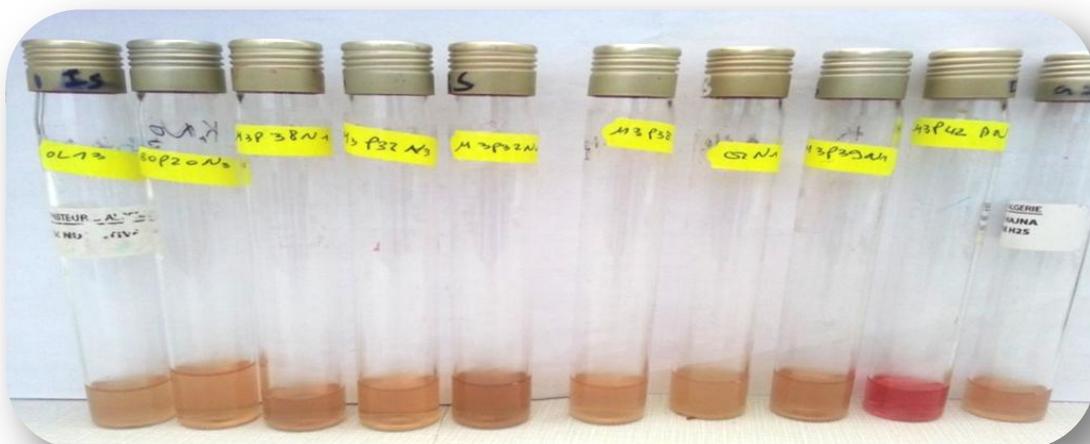
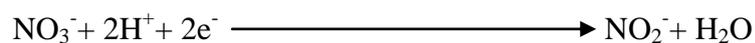


Figure 6. Réduction des nitrates.

2.3.2. 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 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 rose.

Après incubation, les isolats CP17N2, BOP20N3, M1P39N1, M3P38N1, M1P38AN, M3P32N3, M3P42AN ont acidifié le milieu qui a viré vers le jaune (uréase négative) (Photo. 7C). Cette absence de l'enzyme a été également observée chez les isolats de Baaziz et Betchine (2013) isolés à partir des nodules du pois fourrager.

Par contre les souches GP5N2 et GN1 ont alcalinisé le milieu (uréase positive) (Photo. 7A), alors que la souche de référence OL13 et M3P32N4 ont donné une alcalinisation partielle du milieu (Photo. 7B), ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme dans l'équation suivante:



La réaction rend compte de la production de deux moles d'ammoniac qui alcalinisent le milieu. Toutefois, la quantité supérieure d'ammoniac et sa meilleure solubilité conduisent à l'alcalinisation.

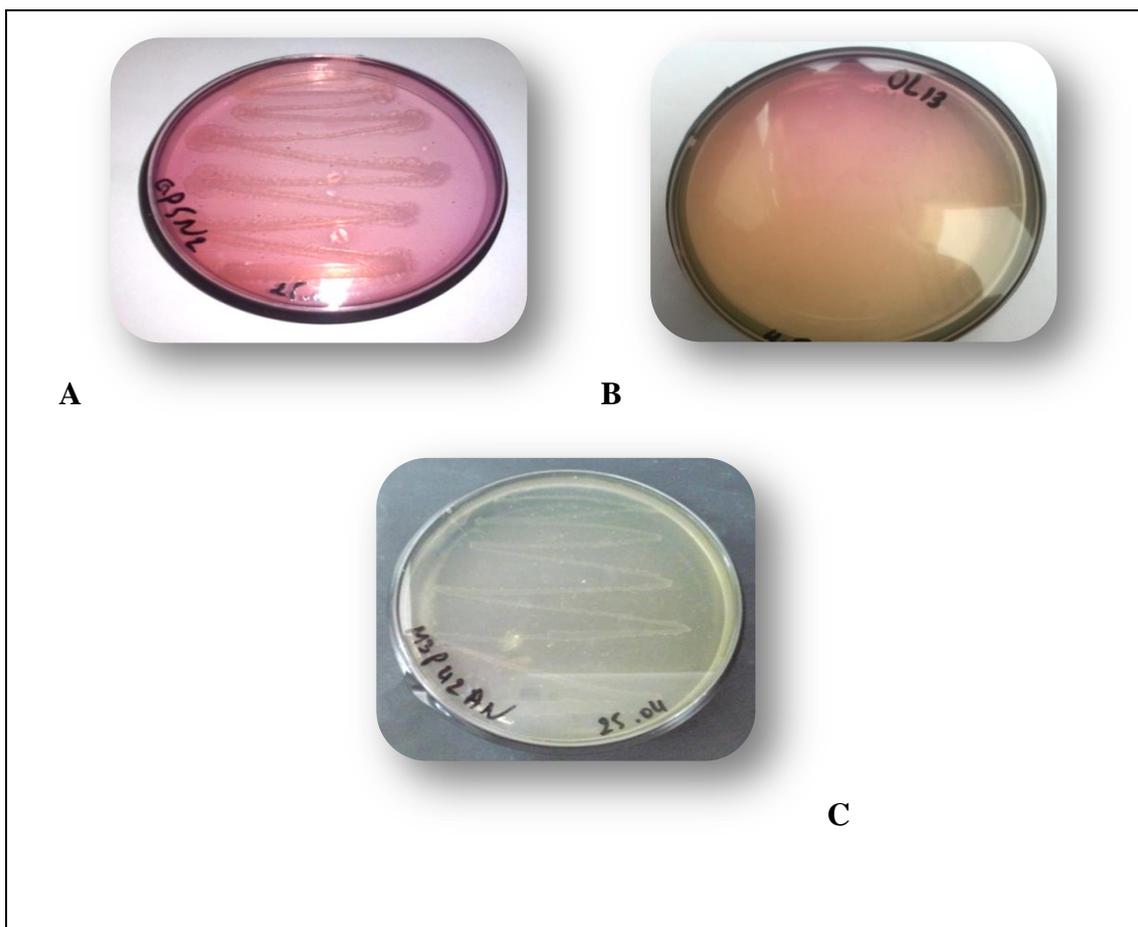


Figure 7. Hydrolyse de l'urée

A: Alcalinisation du milieu **B:** Alcalinisation partielle du milieu
C : Acidification du milieu

2.3.3. 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) (Lindeström et Lehtomak, 1988).

Presque tous les isolats ont présenté une réaction positive (Figure 8) sauf les isolats M3P32N4, M3P32N3 qui ont donné un résultat négatif dans les trois répétitions.

Les résultats obtenus pour cette étude sont en concordance avec ceux obtenus par Struffi et al (1998), qui suppose que les bactéries du genre *Rhizobium* stimulent les plantes à produire des polygalacturonases qui dégradent la paroi

cellulaire au niveau du site d'infection et favorisent la pénétration des *Rhizobia*. Par contre d'autres auteurs ont montré que le *Rhizobium* produit une cellulase qui dégradent les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilitant ainsi la pénétration des *rhizobia* à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et al., 1992).



Figure 8. Activité cellulolytique

2.4. Effet de la température

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YMA, les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 20°C jusqu'à 37°C avec un optimum de croissance entre 20 et 28°C (Tableau 3, Figure 9).

Ces résultats rejoignent ceux de Jordan (1984) et Graham (1992) qui ont constaté que les souches de *R. l. bv. viciae*, prélevées à partir de plantes de *Vicia*, *Lathyrus* et *Pisum* dans des différentes régions de l'Italie se cultive bien entre 20°C à 37°C. Graham (1992) a rapporté que les rhizobiums sont des bactéries mésophiles et leur température optimale de croissance est 28°C.

Toutefois certains isolats tels que CP17N3 et BOP20N3 sont capables de pousser à 45°C et même à 50°C (haute température). Ce résultat corrobore celui de Karanja et wood (1988) qui ont montré que quelques souches de *R. phaseoli* peuvent tolérer des températures de 45 à 50°C.

À 4°C, l'isolat GN1 a montré une bonne croissance en 10 jours, alors que GP5N2 et M1P39N1 ont montré une faible croissance en 20 jours. Ce résultat est en

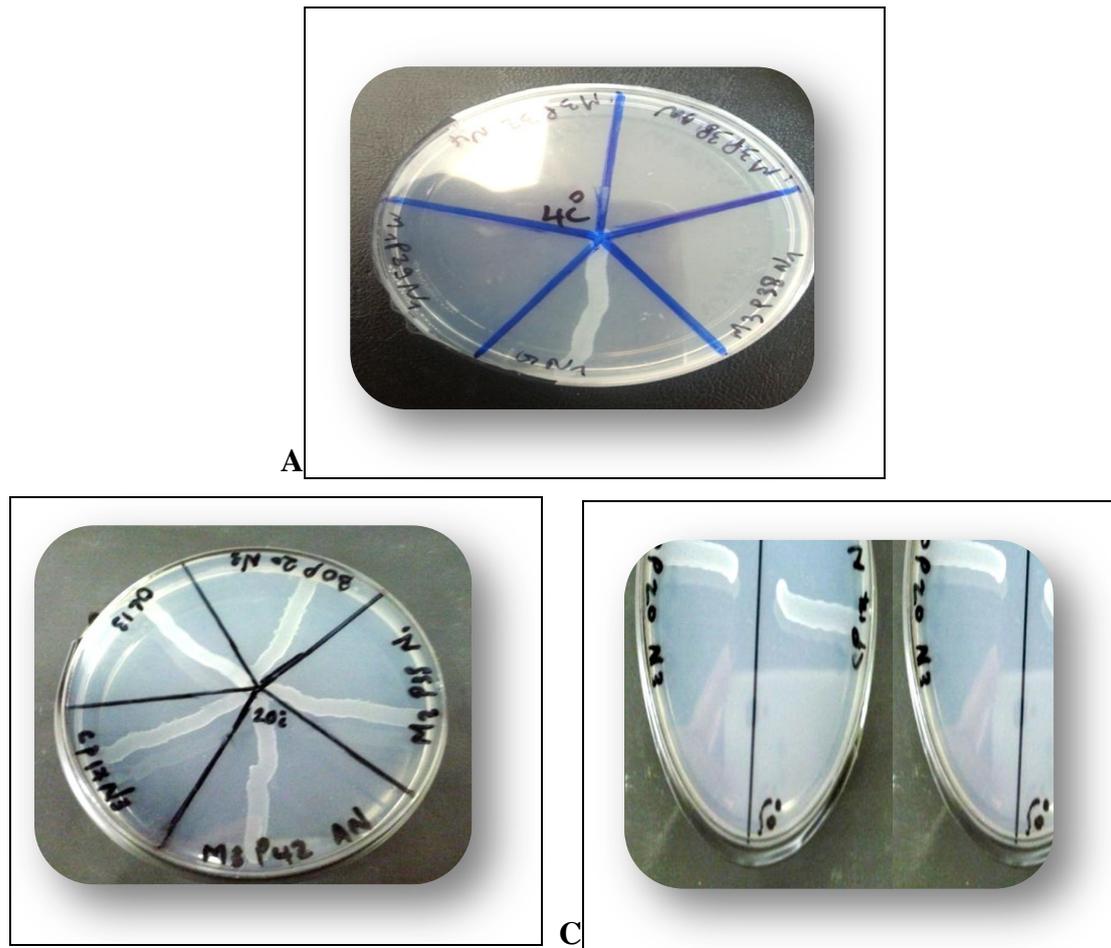
concordance avec celui d'El-Hilali (2006) qui a montré que la plupart des souches isolées des plantes de lupin peuvent croître à 4°C.

Les souches qui résistent aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique, cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räzänen, 2002).

Tableau 3. Croissance des isolats et la souche témoin à différentes températures

Isolats	4°C	20°C	28°C	37°C	45°C	50°C
GP5N2	± 20j	++	+++	+	-	-
GN1	+ 10j	++	++	-	-	-
CP17N2	-	+	+	+	+	+
BOP20N3	-	+	+	+	+	+
M1P39N1	± 20j	+	++	+	-	-
M3P32N3	-	++	+	+	-	-
M3P32N4	-	++	+	-	-	-
M3P38N1	-	+	+	+	-	-
M3P38AN	-	+	++	+	-	-
M3P42AN	-	+	++	+	-	-
OL13	-	++	+	-	-	-

(+++) Très bonne croissance; (++) bonne croissance; (+) croissance moyenne ; (±) faible croissance ; (-) absence de croissance.



B

Figure 9. Croissance des isolats à quelques températures

A : Croissance à 4°C

B : Croissance à 20°C

C : Croissance à 50°C

3. Test de nodulation

Chaque isolat a été testé pour sa capacité de former des nodules sur les racines de la légumineuse *Pisum sativum* L. Après 4 semaines de croissance des plantes (Figure 10), 100% des isolas induisent une nodulation chez la plante hôte. Presque toutes les plantes étaient au stade de préfloraison à l'exception de celle inoculée par GN1 a pu atteindre le stade de la floraison.

Les résultats ont montré que tous les isolats ainsi que la souche de référence ont pu noduler les racines de la plante hôte (Tableau 4).



Figure 10. Croissance des plantes dans la chambre de culture

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 11. Ceci a été observé également chez les isolats de Gaci (2010), isolés à partir des nodules issus du piégeage et des nodules issus de l'isolement direct de *Pisum sativum* L.

La couleur des nodules observée est blanche, la taille est comprise entre 1 et 3mm pour la plupart des cas.

Le nombre moyen de nodules par pied est compris entre 15 et 127. L'isolat le plus infectif correspond à la souche de référence OL13 avec 127 nodules par pied. L'isolat M1P39N1 le moins infectif a pu induire la formation de 15 nodules.

Tableau 4. Nombre et caractéristiques des nodules produits sur chaque plante.

Isolat	Nombre de nodules			Caractéristiques des parties aériennes		Caractéristiques des nodules	
	Nombre total	R. principale	R. secondaires	Taille (cm)	Poids sec (g)	Couleur	Taille (mm)
M3P38N1	100	04	96	74	0,12	Blanche	≤ 2mm
	60	08	52	61	0,16	Blanche	≤ 3mm
M3P38AN	41	04	37	71	0,08	Blanche	≤ 2mm
	58	05	53	60	0,11	Blanche	≤ 3 mm
GN1	15	03	12	71	0,12	Blanche	≤ 1mm
	47	08	39	91	0,17	Blanche	≤ 1mm
BOP20N3	84	00	84	48	0,10	blanche marron	≤ 1
	103	00	103	42	0,06	blanche	≤ 2
M1P39N1	00	00	00	50,5	0,08	/	/
	30	00	30	52,3	0,08	Blanche	≤ 1mm
M3P42AN	20	00	20	85,6	0,08	Blanche	≤ 2mm
	64	00	64	49	0,07	Blanche	≤ 2mm
CP17N2	54	00	54	110	0,21	Blanche	≤ 2mm
	00	00	00	106	0,15	/	/
M3P32N3	43	11	32	97,4	0,13	Blanche	≤ 2mm
	58	12	46	110	0,18	Blanche	≤ 2mm
M3P32N4	28	00	28	84	0,11	Blanche	≤ 2mm
	39	00	39	49,4	0,07	Blanche	≤ 2mm
GP5N2	164	34	130	52,3	0,07	Blanche	≤ 1mm
	81	03	78	99,3	0,14	Blanche	≤ 2mm
OL13	67	10	57	87,3	0,12	Blanche	≤ 3mm
	188	03	185	91,8	0,14	Blanche	≤ 3mm
Témoin non inoculé	00	00	00	67.8	0.07	/	/
	00	00	00	76	0.07	/	/

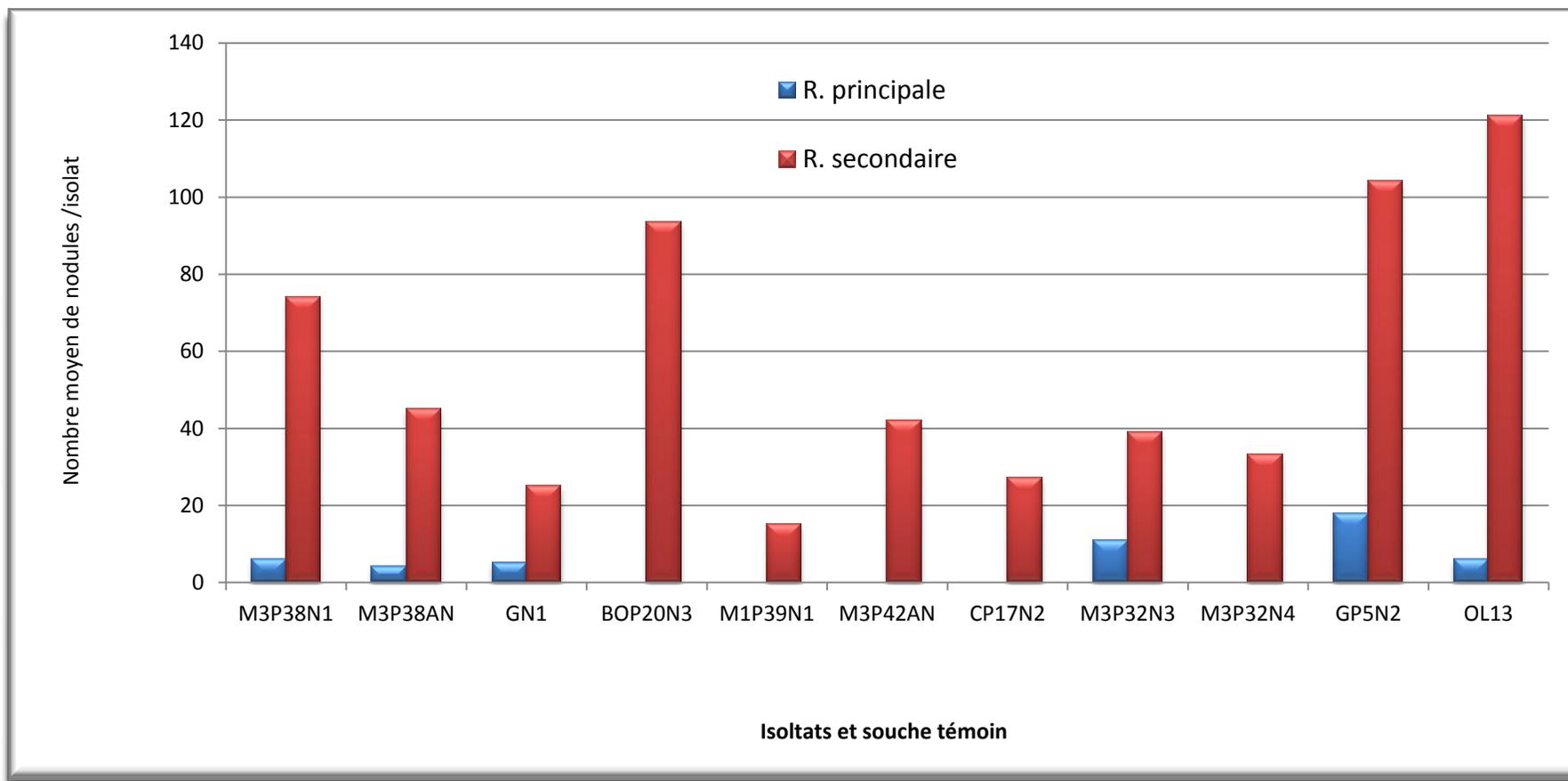


Figure 11. Disposition des nodules sur les racines du pois fourrager

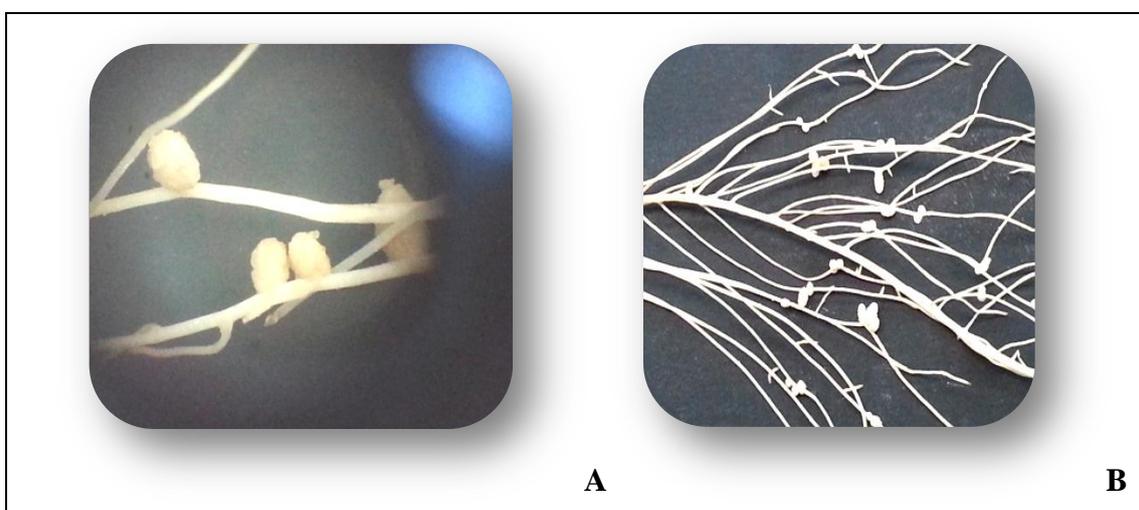


Figure 12. Racines nodulées par quelques isolats

A : M3P32N4 ; **B :** M3P38N1

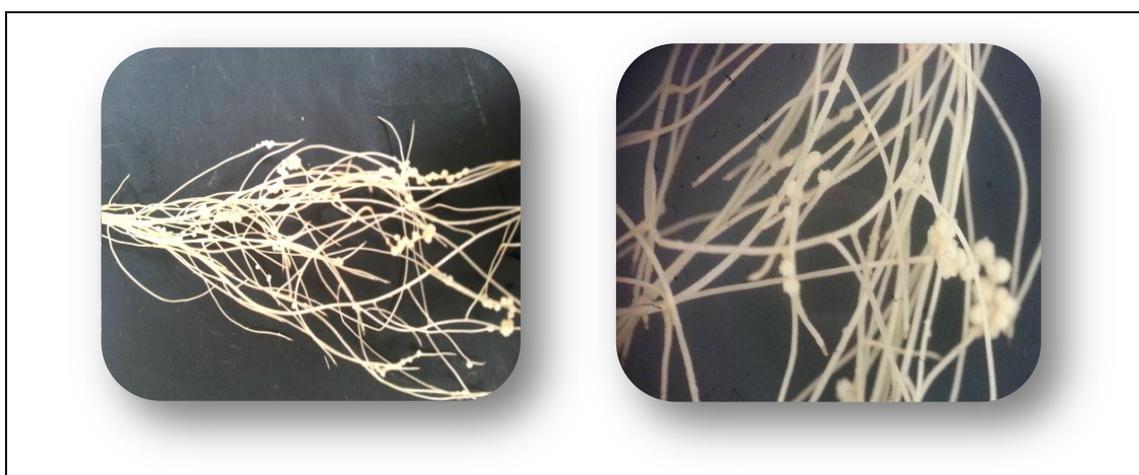


Figure 13. Racines nodulées par la souche de référence OL13

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de l'espèce *Pisum sativum*. L et de les caractériser en présence de souches de référence : OL13

Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux rhizobia (Vincent, 1970; Somasegaran et Hoben, 1994, Jordan, 1984).

En effet les aspects morphologique et cultural des isolats sur les différents milieux de culture attribuent nos isolats à des souches à croissance rapide, et une morphologie des colonies proche du genre *Rhizobium* tel que décrit par Vincent (1982), Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994). Il en est de même pour la croissance des isolats sur milieux spécifiques (absorption du rouge Congo), ces mêmes souches possèdent les enzymes nécessaires pour infecter la plante et induire le processus de nodulation.

A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées de la légumineuse de l'espèce étudiée ont le même aspect morphologique que la souche de référence (souches appartenant au genre *Rhizobium*).

La disponibilité des enzymes nécessaires à l'hydrolyse de constituant de la paroi végétale est testée (cellulase); la même chose pour les enzymes en relation avec le métabolisme azoté (uréase, nitrate-réductase). Toutes les souches y compris celle de référence sont douées d'une activité uréasique, cellulosique (cette dernière est impliquée dans le processus infectieux des racines de la Légumineuse par les isolats. Par ailleurs une enzyme impliquée dans la réduction et transformation des nitrates en nitrites est retrouvée dans toutes les souches (Nitrates-réductase).

Quant à l'effet de température qui a permis une distinction entre les différents isolats. En effet, la température optimale de croissance varie de 20°C à 28°C. Certains isolats peuvent croître à 4°C, alors que d'autres tolèrent bien les températures 45°C et 50°C ce qui n'est pas le cas chez la plupart d'entre eux.

Références

Bibliographiques

Asami S, Kiwamu M., (2006). *Evaluation of the Nitrogen-fixing Ability of Endophytic Clostridia based on Acetylene Reduction and Reverse Transcription-PCR targeting the nifH Transcript and Ribosomal RNA.* Microbes and Environments. 21: 23–35.

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.* Mémoire de Master : Option de Microbiologie : Université Mentouri Constantine. 101p.

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., (1993). Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.

Becking J., (2006). The family *Azotobacteraceae*. Prokaryotes. 6: 759–783.

Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A, Squartini A (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Systematic and Applied Microbiology. 27: 462–468.

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

Benson, D. R et Silvester. W.B., (1999). biology of frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiological Reviews. 57(2): 293-319.

Beringer J.E., 1974. R-Factor transfer in rhizobium legume. J. Gen. Microbiol. 84 pp 188-198.

Berrada. H et Benbrahim. K , (2014). *Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives.* British Microbiology Research Journal 4(6): 616-639.

Boivin , C., Giraud, E.,L.R., Malpica,C.A., and Rosenberg, C, (1997). Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti pSym* plasmid

specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite present in legumes. *Journal of Bacteriology*. 173(9): 2809-2817.

Brencic A, Winans SC., (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 155-194.

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

Chelius MK, Triplett EW., (2000). *Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by Klebsiella pneumoniae in association with Zea mays L.* *Appl Environ Microbiol*. 66: 783–787.

Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P., (2001). *Ralstonia solanaceae* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 51:1729-1735.

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.

Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L., (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 61–71.

de Lajudie P, Willems A, Pot B., (1994). Polyphasic taxonomy of *rhizobia*: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov. And *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst.Bacteriol.*;44:715-733.

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.:978-2-7430-09458.

Dénarié. J., J. Cullimore, (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74:951-954.

Dommergues. Y, Duhoux. E, Diem .H.G., (1999). Les arbres fixateurs d'azote. *Caractérisation fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux.* Éditions espaces 34 (CRAD, FAO ; IRD).

Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M., (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:89-98.

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

Doyle JJ. (2011). *Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation.* *Molecular PlantMicrobe Interactions.* 24: 1289–1295.

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. Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc

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

Fähreus A., (1957). *The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique.* *J. Gen. Microbiol.* 16. pp 354-381

FAO., (1996). Tunisie. Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO.

Fisher HM., (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiology Reviews.* 58: 352–386.

- Foucher F et Kondorosi E., (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43:773-786.
- Franche C, Lindström K, Elmerich C., (2009).** *Nitrogen-fixing bacteria associate with leguminous and non-leguminous plants*. *Plant Soil*. 321: 35–59.
- Frank B., (1889).** Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung*. 24 pp 377-38.
- Franssen ,H.j.,J.-P. Nap,T.Bisseling., (1992).** Nodulins in root nodule development. In : G. Stacey,R.H. Burris, H.J .Evans (eds) ,*Biological Nitrogen Fixation*, FNew York: Chapman and Hall, pp.598-624.
- 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.
- Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Döbereiner J, De Ley J., (1989).** *Acetobacter diazotrophicus sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane*. *International journal of systematic bacteriology*. 39: 361–364.
- Graham P.H., (1992).** *Stress tolerance Rhizobium and Bradyrhizobium and nodulation under adverse soil conditions*. *Can, J. microbial*.38: 484.
- 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.
- Joffin J-N., Leyval Guy., (2006).** *Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques.Tome1*, 4^e édition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.

Jordan DC. (1984). *Rhizobiaceae* In N. R. Krieg and J. G. Holt editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. 234-242.

Kape R.,Parniske M.,et Werner D., (1991). Chemotaxis and nod Gene Activity of Bradyrhizobium japonicum in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. Appl Environ Microbiol 57,316-319.

Karanja et wood, (1988). selecting *rhizobium phaseoli* strains for use with beans *Phaseolus Vulgaris L* in keya. Tolerance of high température and antibiotic resistance *plant soil* 112: 15-22.

Kennedy, I.R, Pereg-Gerk.L.L, Wood, C., Deaker, R, Gilchrist, K., and Katupitiya, S., (1997). *Biological nitrogen fixation in non-leguminous Field crops: Facilitating the evoluton of an effective association between azospirillum and wheat.* Plant and soil.194: 65-79.

Leclerc, H., J. L Gaillard ; M. Simonet., (1995). Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien . DOIN EDITEURS. P 412-415.

Lindström, K. And S. Lehtomäki., (1988). *Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensivity of Rhiz obium sp. (Galega) compared with other fast-growing rhizobia.* FEMS Microbiol. Lett. 50: 277-287.

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.

Masepohl B, Drepper T, Klipp W., (2005). Nitrogen Fixation in the Photosynthetic Purple Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free Living Bacteria, vol. II (Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J. R. and Newton, W. E., eds.), pp. 141-173, Kluwer Academic Publischer.

Mateos P.F, Jose I, jimenez-zurdo, jin chen, Squartini A. Haack S.K. Martinezmolina S. Hubbell D.H. Dazzo F.B., (1992). *Cell-Associated*

Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in Rhizobium leguminosarum Biovar Trifolii. Applied and Environmental Microbiology, Vol 58, N°6, pp 1816-1822.

Mathesius U, Charon C, Rolfe BG, Kondorosi A et Crespi M., (2000). Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white.

Maxted et Bennett, S.J, (2001a). *Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean.* Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht , Netherlands, Kluwer Academic Publ.39:1-32.

Maxted et Bennett, S.J, (2001b). *Legume diversity in the Mediterranean region.* Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Maxted N and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ.39: 51-75.

Meeks JC, Elhai J., (2002). *Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free living and plant associated symbiotic growth states.* Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66: 94 – 121.

Michelle I et Lindeque., (2006). Diversity of root nodule bacteria associated with *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* species in south Africa. University of Protoria .

Moulin, L., Munve, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C., (2001). *Nodulation of legumes by members of β subclass of Proteobacteria.* Nature. 411: 948-950.

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

Newton WE., (2007). Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Ferguson BH, SJ NWE (eds) Biology of nitrogen cycle. Elsevier, Amsterdam, p 109–130.

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

Quezel. P., S Santa., (1962). nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. p.462-541.CNRS.

Räzänen L.A., (2002). *Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia and Prosopis.* Thèse de doctorat. Université d'Helsinki. Finland.

Rees D.S., Kim J., Georgiadis M., Chan M.K., Kimo H., Komiya H., Woo D., Chirino A.J., Schlessman J. HSU B.T., (1993). Structure and fonctions of the nitrogenase proteins in R. Palacios et al (Ed), new horizons in nitrogen fixations. Kluwer Academic Publishers . The Netherlands. P.83-89

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

Riah N, (2014). *Diversité et structure génétique des populations de Rhizobium leguminosarumsymbiovar viciae isolées du pois (Pisum sativum) et de la lentille (Lens culinaris) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien.* Thèse de doctorat: Microbiologie. Université Constantine 1. 96p.

Rodriguez-Navarro DN, Dardanelli MS et Ruiz-Sainz JE, (2007). *Attachment of bacteria to the roots of higher plants.* FEMS Microbiol Lett. 272:127-136.

Roger P., (1996). *La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le developpement.* Conference débat de l'ORSTOM. Paris Xe France.

Savka, M.A., Dessaux, Y.,Oger, P.et Rossbach, S. (2002). *Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere.* Mol Plant Microbe Interact.15:866-874.

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., Hoben, H.J., (1994). Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.

Spaink, H.P., Arts,A., Stacey,G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J ., et Kennedy, E.P., (1992). Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin layer chromatography.MPMI. 5 (1):72-80.

Steenhoudt O, Vanderleyden J., (2000). *Azospirillum. a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses.* genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews. 24: 487–506.

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. supporting bacteria Current Science, vol. 89,N°1.

Taylor LP, Grotewold E., (2005). Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology. 8: 317–323.

Timmers A.C.J, Auriac M.C et Truchet G., (1999). Rfined analysis of early symbiotic steps of the *rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development 126, 3617-3628.

Triplett, E.W., (1996). Diazotrophic endophytes: Progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. Plant & Soil 186:29-38.

Vincent JM., (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.

Wais RJ, Keating DH, Long SR (2002). *Structure-function analysis of nod factor induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis.* Plant Physiology :129, 211-24.

Werner D., (1992). symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

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 droyosis of urea. Anim. Feed Sci. Technol.1:103-113.

Yan Y, Yang J, Dou Y, Chen M, Ping S, Peng J, Lu W, Zhang W, Yao Z, Li H, Liu W, He S, Geng L, Zhang X, Yang F, Yu H, Zhan Y, Li D, Lin Z, Wang Y, Elmerich C, Lin M, Jin Q., (2008). *Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated Pseudomonas stutzeri A1501.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105: 7564 – 7569.

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.

Zakhia, F., Jeder, H. , Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie P., (2004). *Characterisation of wild legumes nodulating bacteria(LNB).* In the infrared zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. 27: 143-153.

Ziada. M et Bellir. D., (2014). *Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes légumineuses Pisum sativum L. cultivée dans différents écosystèmes de l'Est et Centre Algérien.* Mémoire de master: Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 55p.

Les Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

La Composition du milieu YMB en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10,00
K ₂ HPO ₄	0,50
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,20
NaCl.....	0,10
Extrait de levure.....	0,50
Eau distillée.....	1000ml
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La Composition du milieu YMA en g/l (Vincent, 1970)

YMB.....	1000ml
Agar.....	15
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La Composition du milieu YMA+Rouge Congo en g/l (Vincent, 1970)

YMB.....	990ml
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.

La Composition du milieu YMA+BTB (Vincent, 1970)

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

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La composition du milieu GPA+BCP en g/l (Vincent, 1970)

Glucose.....	5
Peptone.....	10
Solution stock de BCP ³	10ml
Agar.....	15
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Solutions stocks colorants

¹Solution 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.

³Solution Stock de BCP : 1g de BCP dissous dans 100ml d'éthanol.

La composition du milieu TY en g/l d'eau distillée (Beringer, 1974)

Tryptone	5.00
Extrait de levure	3.00
CaCl ₂ H ₂ O.....	0,87
pH.....	6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

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

CaCl ₂	0,10
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,12
KH ₂ PO ₄	0,10
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	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

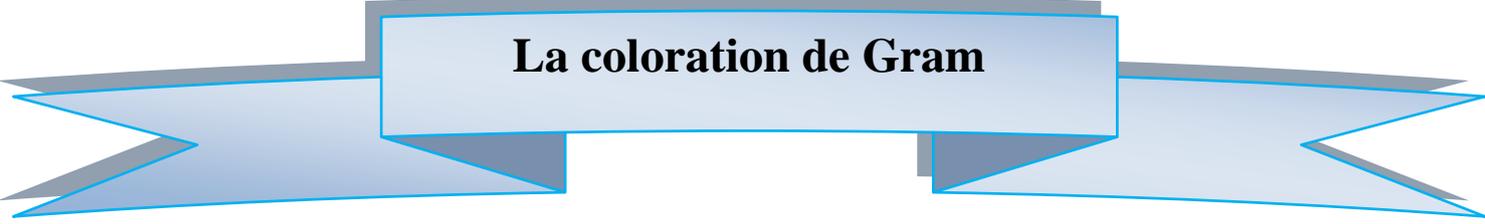
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

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

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

Nair Imen

Date de soutenance: **15/06/2015**

Bendaira Sara

Thème :

**Mise en évidence des B.N.L chez la légumineuse
Pisum sativum L. poussant dans différents écosystèmes
Algériens**

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Microbiologie

Spécialité : Ecologie Microbienne

Résumé

Le Bassin Méditerranéen est le berceau de diversification d'un grand nombre d'espèces végétales d'intérêt fourrager et/ou pastoral.

Parmi de nombreuses légumineuses, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à étudier la biodiversité des bactéries nodulant le pois fourrager. 10 isolats isolés à partir des nodules de la plante sont caractérisés par une étude phénotypique. Les résultats sont comparés à ceux de la souche témoin *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* OL13.

La croissance sur les milieux de cultures YMA+RC et GPA+BGP, les tests biochimiques ainsi que la tolérance à la température montrent une diversité entre les isolats.

Le test de nodulation a été effectué pour mettre en évidence l'aptitude des isolats à noduler les racines de la plante *Pisum sativum* L., les résultats ont confirmé que ce sont tous le microsymbiont de la plante hôte.

Mots clés: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, les nodules racinaires, B.N.L, symbiose.

Laboratoire de recherche :

Laboratoire d'écologie microbienne-Département de Microbiologie-Faculté des Sciences de la nature et de la vie- Université des Frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Alatou Radia (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Rapporteur : Mlle Gaci Meriem (Maitre-assistante « A »- UFM Constantine).

Examineurs : Mme Riah Nassira (Maitre de Conférences- UFM Constantine).