



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 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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*

Intitulé :

Evaluation de la croissance des plantes de la lentille cultivée en plein champ et caractérisation physiologique de quelques souches nodulant
Lens culinaris

Présenté et soutenu par : *ACHOURI Mohamed Anis*

Le : 27/06/2018

ABDI Abdellah

BENDJABEUR Merouane

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. R. Alatou (MCA - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme. N. Riah (MCB - UFM Constantine).

Examineur : Melle. M.Gaci (MAA- UFM Constantine)

Année universitaire
2017 – 2018

Remerciements

Tout d'abord, je rends grâce à Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.

Ces pages sont l'occasion pour moi de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ce mémoire.

Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur Mme Riah Nassira, qui a proposé ce thème de mémoire, et pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur, ses précieux conseils, et sa disponibilité durant notre préparation du mémoire.

Un grand merci aux membres du jury: Mme Alatou Radia maitre de conférences «A» à U.F.M Constantine et Mme Gaci Meriem maitre assistante « A » à U.F.M Constantine à d'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leur générosité, et leur grande patience.

Notre plus grande gratitude à nos chers parents pour leur soutien et de nous avoir permis de faire des études en nous conduisant à présenter ce master.

On aimerait aussi remercier nos frères et sœurs, pour leur soutien sans faille.

A toute l'équipe du laboratoire de l'écologie microbienne du département de Microbiologie de l'université des frères Mentouri de Constantine pour leur soutien matériel et moral.

Dédicace

« La patience et la persévérance sont les deux premiers éléments de succès en matière d'éducation. »

Citation de [Johann David Wyss](#) ; Le Robinson suisse (1812)

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidés vers le droit chemin, de nous avoir aidés tout au long de nos années d'étude.

A ce stade, Je tiens à dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, ma maman ZOHRRA et mon papa AHMED, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

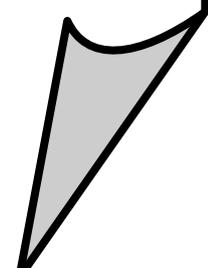
A mes chers frères : Med Rafik, Nadir, Chouaib, Oualid et Khaireddine qui m'ont soutenu durant tout mon parcours et qui n'ont pas cessé de me conseiller.

A mes chères sœurs : Nidal et Asma qu'elles étaient toujours à mes cotés et qu'elles m'ont encouragé sans cesse.

A mes amis.

A tous ceux qui me sont chers.

ABDI ABDELLAH



Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A la mémoire de mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Que DIEU garde son âme dans son vaste paradis.

A ma très chère maman en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont elle a fait preuve à mon égard.

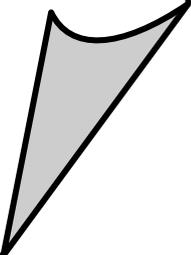
Un spécial remerciement pour ma grande sœur Sofia qui m'a toujours soutenu, qui a fait des sacrifices et crûs en moi tout au long de mon parcours scolaire.

A mon beau frère Rami, merci énormément pour ton aide.

A mes chères sœurs, et mes chers frères, ma vie ne serait pas aussi magique sans votre présence et votre amour.

A toute ma famille.

BENDJABEUR MEROUANE



Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots que je dédie ce modeste travail de fin d'étude

A La Mémoire De Ma Mère « SALIMA »

Ce travail est dédié pour elle, décédée il y'a 5 ans, aucune dédicace n'aurait exprimé mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien-être.

J'espère que, du monde qui est le sien maintenant, elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

A Mon Père « NOURREDINE », Ma Grand-Mère «BOUBA »

Qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite, et m'ont éclairé le chemin par leur conseils judicieux, leur soutiens et encouragements, et pour tous les moments où vous n'avez jamais épargné le moindre effort pour m'aider et m'encourager.

A mes oncles, notamment YACINE, qui était toujours présent a me donner des précieux conseils, des aides, et des encouragements tout le temps.

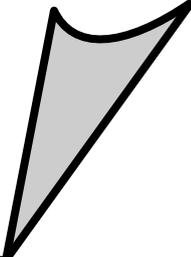
A mes frères FAKHROU et LINA.

A mon cousin Medjdoub, mes grands parents, mes tantes maternelles et paternelles et leurs enfants.

A mes collègues, et à tous mes amis les plus chers.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ACHOURI MOHAMED ANIS



Résumé

Dans cette étude, 8 bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de la lentille (*Lens culinaris*) cultivée en plein champ dans la région Massine d'El Khroub Constantine.

Une légère différence significative concernant le développement des plantes a été repéré entre les différents champs.

La caractérisation morphologique et culturale des isolats a permis de classer nos isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium*.

La caractérisation physiologique des isolats a mis en évidence une température optimale de croissance à 28°C et un pH optimum de 6,8. La majorité des isolats n'ont toléré aucune concentration de NaCl.

L'isolat Ch43 a montré une exception de tolérance élevée aux différents facteurs abiotiques (pH = 11, Température = 37°C et 5% de NaCl).

Mots clés : *Lens culinaris*, *Rhizobium*, caractérisation phénotypique, nodules racinaires, croissance des plantes.

Abstract

In this study, 8 bacteria were isolated from the root nodules of the lentil (*Lens culinaris*) grown in the field in the Massine region of El Khroub Constantine.

A slight significant difference in plant development was identified between the different fields.

Morphological and cultural characterization of isolates has classified our isolates as fast-growing bacteria with the characteristics of Rhizobium bacteria.

Physiological characterization of the isolates showed an optimal growth temperature of 28°C and an optimum pH of 6.8. The majority of isolates did not tolerate any NaCl concentration.

The Ch43 isolate showed a high tolerance exception corresponding to the different abiotic factors (pH = 11, Temperature = 37°C and 5% NaCl).

Keywords : *Lens culinaris*, Rhizobium, phenotypic characterization, root nodules, plant growth.

ملخص

في هذه الدراسة تم عزل 8 بكتيريا من العقد الجذرية لنبتة العدس *Lens culinaris* المغروسة في حقول مفتوحة بضواحي ماسين بدائرة الخروب في ولاية قسنطينة.

لقد وجد هناك فرق طفيف في نمو و تطور النباتات على مستوى مختلف الحقول.

التوصيف المورفولوجي سمح لنا بتصنيف المعزولات عل انها معزولات سريعة النمو، تمثل الخصائص المناسبة لبكتيريا *Rhizobium*.

اظهرت الخصائص الفيزيولوجية ان درجة الحرارة الامثل للنمو هي 28°C و pH مثالي يساوي 6,8. اغلب المعزولات لم تتحمل التركيزات المختلفة لكلوريد الصوديوم NaCl.

باستثناء المعزولة Ch43 التي كانت قادرة على تحمل العوامل غير الحيوية المختلفة pH=11 ، درجة الحرارة 37°C ، تركيز 5% لكلوريد الصوديوم.

الكلمات المفتاحية : *Lens culinaris* ، *Rhizobium* ، التوصيف الظاهري ، العقد الجذرية ، نمو النباتات.

Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestre	4
Figure 2 : Arbre phylogénétique simplifié représentant les différentes classes des protéobactéries, basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S.....	9
Figure 3 : Description morphologique de la lentille.....	11
Figure 4 : Les étapes du mécanisme de nodulation.....	15
Figure 5 : Localisation géographique montrant le lieu de prélèvement.....	17
Figure 6 : Echantillonnage des plantes.....	19
Figure 7 : Parties aériennes, racines, les nodules de la plante représentative.....	20
Figure 8 : Conservation des nodules par déshydratation	21
Figure 9 : Développement des parties aériennes de la lentille dans les différents champs.la comparaison de la moyenne entre les différents champs selon le test de Fisher LSD à $P \leq 0.05$ révèle des groupes présentés par des lettres minuscules.....	24
Figure 10 : Variabilité du nombre de nodules dans les champs .la comparaison de la moyenne entre les différents champs selon le test de Fisher LSD à $P \leq 0.05$ révèle des groupes présentés par des lettres minuscules. Les barres d'histogrammes suivis de la même lettre ne sont pas significativement différentes.....	24
Figure 11 : Variabilité du nombre de nodules dans les champs .la comparaison de la moyenne entre les différents champs selon le test de Fisher LSD à $P \leq 0.05$ révèle des groupes présentés par des lettres minuscules. . Les barres d'histogrammes suivis de la même lettre ne sont pas significativement différentes.....	25
Figure 12 : Croissance des isolats sur milieux YMA + BTB.....	26
Figure 13 : Absence de croissance sur milieu GPA+BCP.....	27
Figure 14 : Croissance sur milieu YMA + Rouge Congo.....	27
Figure 15 : Aspect microscopique des colonies.....	28
Figure 16 : Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl.....	30
Figure 17 : Croissance des isolats sur différentes températures.....	32
Figure 18 : Croissance des isolats à différents pH.....	34

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Différents isolats par champ.....	23
Tableau 02 : Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl.....	29
Tableau 03 : Croissance des isolats sur différentes températures.....	31
Tableau 04 : Croissance des isolats à différents pH.....	33

LISTE DES ABREVIATIONS

BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses

BTB: Bleu de bromothymol

BTP: Pourpre de bromocrésol

GPA : Glucose Peptone Agar

LCO : Lipochitinoooligosaccharides

LPS: Lipopolysaccharide

NaCl: Chlorure de sodium Pb: Paire de base .

R: *Rhizobium*

RC: Rouge Congo

TY: Tryptone Yeast Agar

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast-Mannitol-Broth

Introduction	1
Chapitre 01 : Revue bibliographique	
1. L'azote.....	3
1.1. Fixation biologique de l'azote.....	3
1.2. Cycle de l'azote.....	3
1.3. Fixateurs de l'azote.....	5
1.3.1. Fixateurs libres.....	5
1.3.2. Fixateurs symbiotiques.....	5
1.4. Facteurs limitant la fixation biologique de l'azote	5
1.4.1. Facteurs édaphiques.....	6
1.4.2. Facteurs climatiques.....	6
1.4.3. Facteurs biotiques	6
1.4.4. Facteurs agronomiques.....	7
2. symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse.....	7
2.1. Généralités sur <i>Rhizobium</i>	7
2.1.1. Diversité taxonomique des rhizobiums.....	8
2.1.2. Rhizobiums associés à la lentille.....	9
2.2. Généralités sur les légumineuses.....	9
2.3. <i>Lens culinaris</i>	10
2.3.1. Taxonomie.....	10
2.3.2. Description de la plante.....	11
2.3.3. Intérêt agronomique et nutritionnel de la lentille.....	11
3. Etablissement de la symbiose rhizobienne.....	12
3.1. Mécanisme et spécificité de la reconnaissance symbiotique.....	12
3.1.1. Pré-infection.....	12
3.1.2. Infection.....	12

3.1.3. Développement du nodule et libération des bactéries.....	13
4. Génétique de la nodulation	13
4.1. Gènes Nod.....	14
4.2. Gènes nif.....	14
4.3. Gènes fix.....	14
4.4. Gènes de la plante hôte.....	15
4.4.1. Léghémoglobine	15

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal et culture des plantes.....	17
2. Echantillonnage des plantes.....	17
3. Paramètres mesurés.....	18
4. Analyse statistique.....	18
5. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	20
5.1. Collecte et conservation des nodules.....	20
5.2. Stérilisation des nodules.....	22
5.3. Ecrasement et isolement des bactéries à partir des nodosités.....	22
5.4. Purification et conservation des isolats.....	22
5.5. Examen microscopique par la coloration de Gram.....	23
6. Tests physiologiques.....	23
6.1. Tolérance au chlorure de sodium (NaCl).....	23
6.2. Effet de la température.....	23
6.3. Effet du pH.....	23

Chapitre 03 : Résultats et discussion

1. Comparaison de la croissance des plantes entre les différents champs.....	24
1.1. Croissances des parties aériennes.....	24
1.2. Effet de la nodulation.....	24

TABLE DES MATIERES

1.2.1. Nombre des nodules.....	24
1.2.2. Masse nodulaire.....	25
1.2.3. Taille nodulaire.....	25
1.3. Discussion.....	25
2. Caractérisation phénotypique des isolats.....	26
2.1. Etude morphologique et culturale.....	26
2.2. Caractérisation microscopique.....	28
2.3. Tests physiologiques.....	28
2.3.1. Tolérance au chlorure de sodium (NaCl).....	28
2.3.2. Effet de la température.....	30
2.3.3. Effet du pH.....	33
Conclusion	35
Références bibliographiques	36
Annexes	

Introduction

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique de l'azote moléculaire du globe, les plus étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type *rhizobiums* et des plantes de la famille des légumineuses (de Faria *et al.*, 1989).

En 1838, Boussingault mit en évidence l'aptitude des légumineuses à utiliser l'azote atmosphérique, et en 1888, les chimistes allemands Hellriegel et Wilfarth ont démontré que cette aptitude est liée au développement des nodosités suivant l'infection des racines par des microorganismes du sol (Brewin, 2002).

La famille des légumineuses est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. Elle est cultivée dans le monde entier à des fins alimentaires, fourragères, médicinales ou encore écologiques et agricoles. Cependant, l'intérêt des Fabacées est directement lié à leur capacité d'établir avec les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) une symbiose fixatrice d'azote (Chen *et al.*, 1995).

Les bactéries nodulant les légumineuses du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, qui ont une signification scientifique et agronomique profondes dues à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, cette relation est d'une importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Somasegaran et Hoben, 1994).

La symbiose *Rhizobium* - légumineuse est de type mutualisme, où la plante apporte les nutriments carbonés et une niche écologique adéquate à la bactérie, en revanche la bactérie fixe l'azote atmosphérique à son partenaire végétal. Les légumineuses en association avec les rhizobiums permettent l'introduction d'azote combiné dans le sol pour augmenter sa fertilité et réduire ainsi l'utilisation des engrais chimiques, mais l'efficacité de cette symbiose est dépendante de l'hôte et du symbiote en relation (Bala et Griller, 2001).

En Algérie, les légumineuses, font partie du paysage agricole depuis des millénaires. Ces cultures sont utilisées dans la rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumineuses cultivées représentent une importante source protéique car elles produisent des protéines en abondance (leurs graines contiennent 3 fois plus de protéines que ceux des céréales), sans fertilisation azotée. Ainsi, elles constituent une importante source de nourriture humaine susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une

large partie de la population algérienne (pois chiche, haricot, pois, lentilles, arachide, fève...). Ces légumineuses sont aussi calorifiques et riches en glucides que le blé (Ministère de l'Agriculture, 2002).

Notre travail est basé sur l'étude d'une comparaison de la croissance des plantes de la lentille cultivée (parties aériennes, racines, nombre nodule, masse et taille nodulaire) dans 4 champs d'expérimentation différents situés dans la région de l'exploitation agricole de monsieur ACHOURI N. à Constantine (Massine d'El Khroub).

Une caractérisation phénotypique des bactéries nodulant les racines de la lentille a été effectuée selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules racinaires,
- Etude morphologique, culturale et microscopique des isolats,
- Caractérisation physiologiques des isolats (effet du NaCl, pH et température).

Revue

bibliographique

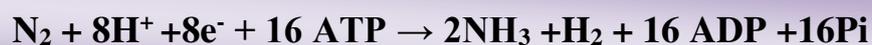
1. L'azote

Constituant entre autres des acides aminés et nucléiques, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie.

L'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N₂) non assimilable par les plantes alors qu'il constitue, avec le manque d'eau et de phosphate, une des principales limitations à la croissance des plantes. Dans le milieu naturelle, l'azote se trouve sous forme organique et inorganique, l'azote assimilable par les plantes se manifeste sous forme inorganique : NH₄⁺ NO₃⁻ (Madigan et Martinko., 2007).

1.1. Fixation biologique de l'azote

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 ammoniac. Cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004).



1.2. Cycle de l'azote:

Dans les sols bien oxygénés, des bactéries transforment l'ammoniac en nitrite (NO₂⁻), puis en nitrates (NO₃⁻) au cours du processus de nitrification. Les racines absorbent alors les ions nitrate (NO₃⁻) libérés par les bactéries et, dans une moindre mesure, l'ammonium présent dans le sol. Ils seront principalement incorporés dans les acides aminés et les protéines. Les plantes symbiotes fournissent aux bactéries l'énergie nécessaire à la nitrification grâce aux glucides de la sève élaborée. Les végétaux constituent ainsi la source primaire d'azote assimilable par la majorité des animaux herbivores (Figure 1) (Barbault, 2009).

a) La nitrification

La nitrification est la conversion biologique de l'azote minéral réduit (NH_4^+) en azote minéral oxydé sous forme de NO_3^- en passant par le NO_2^- . C'est un processus d'oxydation contrôlé par certains microorganismes spécifiques, qui conduit la transformation de l'ion ammonium en nitrite, puis celle de nitrite en nitrate (Barbault, 2009).

b) La dénitrification:

Il s'agit d'un procédé biologique où les bactéries dites dénitrifiantes en présence de la matière organique transforment les nitrates en diazote. Le diazote retourne alors dans l'atmosphère. Cette réaction chimique produit aussi du CO_2 et de l'oxyde d'azote (N_2O) (Barbault, 2009).

c) L'ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH_4^+) sous l'action de microorganismes hétérotrophes car elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO_2^- en NO_3^- . Cette forme est transitoire et sera transformée ensuite en azote nitrique (Barbault, 2009).

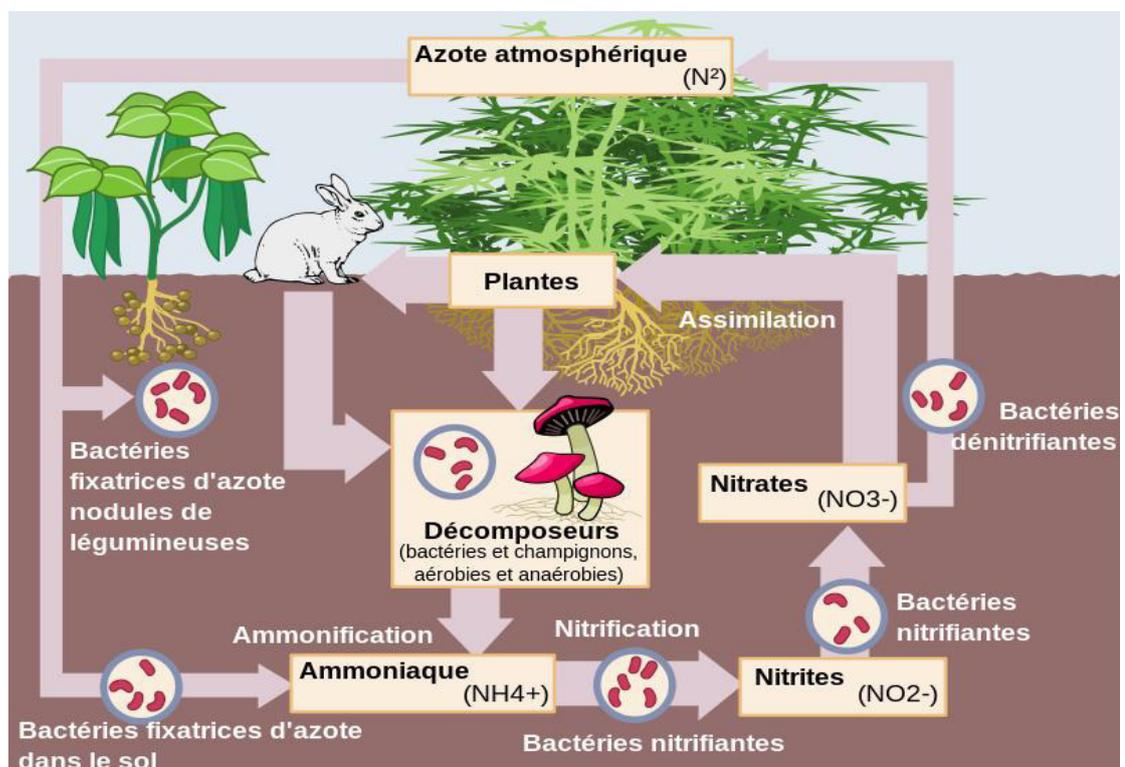


Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic., 2009)

1.3. Fixateurs de l'Azote

1.3.1. Fixateurs libres

Les fixateurs libres sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique, ils comprennent des genres de bactéries très divers : bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*), bactéries phototrophes (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*). Ces bactéries fixatrices libres sont des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique. Certaines associations vont de la simple multiplication bactérienne à la surface de la racine et la colonisation des espaces intercellulaires, c'est une caractérisation 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).

1.3.2. Fixateurs symbiotiques

Les bactéries du sol Gram négatif appelées rhizobiums sont capables de s'associer avec des plantes de la famille des légumineuses. Cette symbiose aboutit à la formation des nodules fixateurs d'azote sur les racines, parfois sur les tiges. Le genre *Parasponia* de la famille des Ulmacées est la seule exception d'une plante non légumineuse qui présente ce caractère. Les Actinomycètes du genre *Frankia* (bactérie Gram positif, filamenteuses et sporulantes) nodulent les plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones, dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina*. Une symbiose particulière concerne la cyanobactérie *Anabaena* associée à la fougère aquatique *Azolla*, qui est utilisée comme engrais vert dans les rizières (Duhoux et Nicole, 2004).

1.4. Facteurs limitant la fixation biologique de l'azote

Des facteurs d'ordre biotique et abiotique peuvent affecter positivement ou négativement le processus de fixation biologique de l'azote par les légumineuses alimentaires et son efficacité. Parmi ces facteurs, nous citons :

1.4.1. Facteurs édaphiques

Ils sont liés au sol dans le lequel pousse la légumineuse. Les plus importants en sont les suivants :

- Le pH acide du sol ;
 - La carence du sol en phosphore. En plus de son intervention dans la formation des ATP, le phosphore intervient aussi dans le processus du transport des produits de la photosynthèse (sucres) de la feuille vers les nodosités. Un manque de phosphore réduit la croissance des racines de plante, la photosynthèse, le transport des sucres et autres fonctions physiologiques de la plante liée directement ou indirectement à la fixation de l'azote ;
 - La teneur excessive du sol en azote. L'azote minéral présent dans la rhizosphère inhibe la nodulation et l'activité de la nitrogénase. La fixation d'azote nécessite une quantité importante d'énergie de la part de la plante, aussi elle préfère l'absorber du sol avec moins de dépenses énergétiques ;
 - La carence du sol en Ca, K, Mo, Fe, Cu, Co, et en bore. Ces éléments sont des composantes nécessaires à l'activité de la nitrogénase ;
 - L'excès d'humidité ;
- La sécheresse (du sol) qui peut inhiber la fixation (Hamadache, 2014).

1.4.2. Facteurs climatiques

Il s'agit surtout de la température et de la lumière. La température basse ou haute agit surtout sur la nitrogénase. La lumière agit sur l'intensité de la photosynthèse et la fabrication des carbohydrates, sources d'énergie pour la bactérie, par la légumineuse (Hamadache, 2014).

1.4.3. Facteurs biotiques

Le principal facteur biotique limitant la fixation biologique de l'azote est l'absence de la souche de *Rhizobium* spécifique à la culture. L'état phytosanitaire de la culture, c'est-à-dire les attaques d'insectes ou de maladies foliaires et des nématodes, est aussi un facteur biotique qui affecte négativement l'activité (Hamadache, 2014).

1.4.4. Facteurs agronomiques

- La date précoce de semis.
- La densité élevée de semis.
- La forte teneur du sol en azote nitrique au semis. La fixation d'azote par les bactéries est souvent forte si la teneur du sol en azote minéral est inférieure à 50kg/ha. Une teneur du sol en azote minérale égale ou supérieure à 200kg/ha inhibe complètement la fixation symbiotique. Les fortes activités fixatrices d'azote sont donc à noter dans les sols à faible teneur en azote minéral.

Le labour (Hamadache, 2014).

2. Symbiose *Rhizobium*- légumineuse

2.1.Généralités sur *Rhizobium*

a) Caractères morphologiques : Du grec rhiza qui signifie (racine) et bio (vie), *Rhizobium* signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Ce sont des bactéries Gram négatif, non sporulantes, on distingue deux formes :

- **La forme végétative :** les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobiums à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobiums à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **La forme bactéroïde:** à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994) (Duhoux et Nicole, 2004).

b) Caractères biochimiques : les rhizobiums sont des bactéries hétérotrophes, ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994).

c) Caractères physiologiques : *Rhizobium* est un microorganisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6,8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

d) Caractères culturels : les rhizobiums à croissance rapide produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours. *Bradyrhizobium* à croissance lente. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours. Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobiums, sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaires, blanches, opaques ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pales rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

2.1.1. Diversité taxonomique des rhizobiums

La classification des rhizobiums est basée sur leur capacité symbiotique et leur spécificité d'hôte, toutes les bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses étaient classées en un seul genre *Rhizobium*. Aujourd'hui, le terme de bactérie nodulant les légumineuses (BNL) utilisé par Zakhia *et al* (2004) est plus adéquat et convient mieux que celui de rhizobiums qui dérive du nom du genre *Rhizobium*, pour désigner l'ensemble des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques capables d'entrer en symbiose avec les légumineuses. Actuellement, les rhizobiums sont 13 genres et 98 espèces symbiotiques appartenant aux sous classes alpha et beta Protéobactéries (Weir, 2016). Quatre genres d' α -Protéobactéries constituent les symbiotes majoritaires de la plupart des espèces de légumineuses rencontrées à travers le monde : *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) et *Bradyrhizobium* (Figure 2). La taxonomie des rhizobiums a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études.

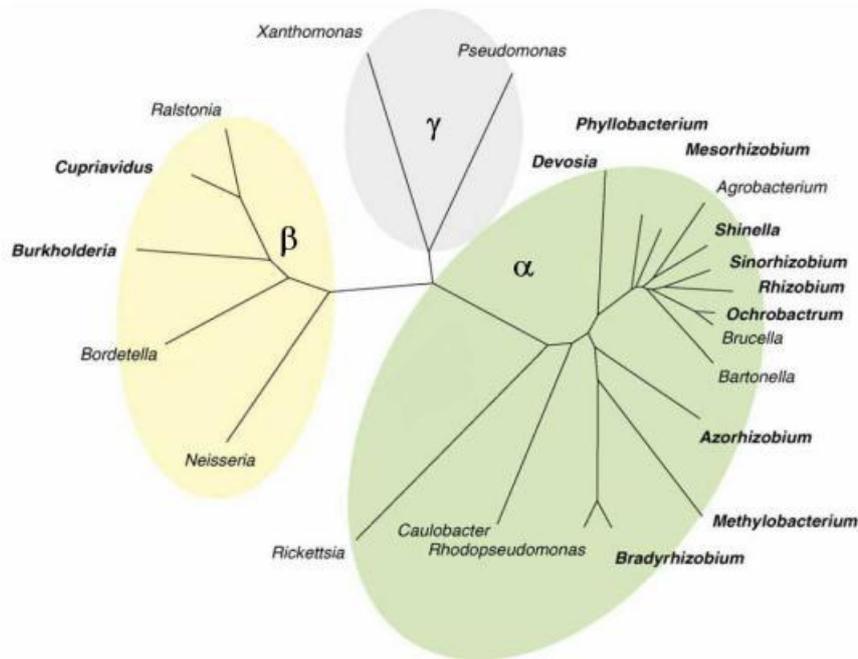


Figure 2 : Arbre phylogénétique simplifié représentant les différentes classes des Protéobactéries, basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

2.1.2. Rhizobiums associés à la lentille

Lens culinaris appartenant à la tribu des Viciae (*Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*...) a longtemps été considérées comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce bactérienne, *Rhizobium leguminosarum sv viciae*. Cette classification a changé au cours des dernières années. Récemment de nouvelles espèces nodulant la lentille au Bangladesh ont été proposées tel que : *Rhizobium bangladeshense* et *Rhizobium binae* (Rashid *et al.*, 2015).

2.2. Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne...). La famille des légumineuses ou Fabacées est la troisième des plus grandes familles de plantes à fleurs (après les orchidées et les astéracées), avec environ 650 genres et près de 20000 espèces (Gepts *et al.*, 2005). Ces espèces sont réparties en trois sous-familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae*, et *Papilionoideae*, elles constituent de loin le groupe le plus important de

plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Doyle et Luckow, 2003).

- **Caesalpinioideae** : sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles de l'extérieur.
- **Mimosoideae** : sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces.
- **Papilionoideae ou Fabaceae** : Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de «papillon» La sous-famille des papilionoideae regroupe les espèces cultivées comme : le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), et la lentille (*Lens culinaris*) . Elle est cosmopolite et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus. Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Duhoux et Nicole, 2004).

2.3. *Lens culinaris*

2.3.1. Taxonomie

Domaine:	<i>Biota</i>
Règne :	<i>Plantae</i>
Classe:	<i>Equisetopsida</i>
Ordre:	<i>Fabales</i>
Famille:	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille:	<i>Faboideae</i>
Tribu:	<i>Fabeae</i>
Genre:	<i>Lens</i>
Espèce:	<i>Lens culinaris</i>

2.3.2. Description de la plante

La lentille cultivée (*Lens culinaris*) est une espèce de plantes dicotylédones annuelles appartenant à la famille des *Fabaceae* ou légumineuses, elle est probablement originaire d'Asie occidentale, d'où elle s'est diffusée vers la méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe (Brink et Belay, 2006).

Description morphologique: La lentille est une plante annuelle herbacée de 20 à 72 cm de haut la Figure 3 montre les différentes étapes de la description morphologique de la lentille.

- **La tige:** dressée et très rameuse.
- **La feuille:** alternée, est composée de 1 à 8 paires de petites folioles. La couleur de la foliole varie du vert clair au vert bleuâtre et se termine par une vrille.
- **La fleur:** est une papilionacée, auto fertile et de couleur blanche.
- **La gousse:** (fruit) est oblongue, glabre compressée latéralement et contient une ou deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé. La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé.....), alors que le nombre de gousses par plante varie largement en fonction de la densité de semis et de la variété.
- **La graine :** petite de taille, le poids de 100 graines varie entre 2 et 8 grammes (Hamadache, 2014)



a- Fleur

b- Graines

c- Tige et gousse

Figure 3: Description morphologique de la lentille (Hamadache, 2014)

2.3.3. Intérêt agronomique et nutritionnel de la lentille

La culture de la lentille enrichit le sol en azote, donc elle induit une diminution en apport en engrais azoté et assure un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation agricole et la diversification de la production agricole. La plante est surtout cultivée pour ses graines, récoltées et exportées comme aliment. Cependant, la paille

est aussi utilisée, comme aliment de qualité supérieure pour le bétail ou comme source de matière organique pour l'amélioration des sols (Saskatchewan Pulse Growers, 2000). Les graines de lentille peuvent servir de nourriture parfois aux animaux, en particulier les volailles pour leur procurer des protéines. La lentille se cultive parfois pour le fourrage ou comme engrais vert (Brink et Belay, 2006).

3. Etablissement de la symbiose rhizobienne

L'établissement de la symbiose entre Rhizobiums et la plante légumineuse est un phénomène complexe. L'interaction symbiotique entre les bactéries Rhizobiums et les plantes de la famille des légumineuses se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, Fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac (Perry *et al.*, 2004).

3.1. Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique

Le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection (figure 4) (Patriarca *et al.*, 2004).

3.1.1. Pré-infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie (Patriarca *et al.*, 2004). En condition de carence en ions ammonium (NH_4^+), la bactérie et la plante mettent en place un système de « dialogue » basé sur un échange de molécules chimiques (Perry *et al.*, 2004). Les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ce signal, une fois perçu par le *Rhizobium*, induit l'expression de gènes nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitinoooligosaccharides ou LCO) (Dénarié, 2000). L'interaction est spécifique: une souche bactérienne n'attaque pas n'importe quelle plante, et inversement la plante ne se laisse pas envahir par n'importe quelle souche bactérienne (Pelmont, 1995).

3.1.2. Infection

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire (Hopkins, 1999). Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une

molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de Rhizobiums, la rhicadhésine est une protéine qui lie le calcium. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry *et al.*, 2004). La bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemme (Hopkins, 2003). L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine (Duhoux *et al.*, 2004). Certains des poils absorbants infectés se courbent et forment une « crosse de berger » à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient. C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhoux *et al.*, 2004).

3.1.3. Développement du nodule et libération des bactéries

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins *et al.*, 2003). La division bactérienne rapide entraîne la formation d'un nodule (Perry *et al.*, 2004). La formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des ordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi, 2001). La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane péribactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004). Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

4. Génétique de la nodulation

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de rhizobiums et dans le chromosome des souches de *Bradyrhizobium* (Raven *et al.*, 2000). De nombreux gènes bactériens interviennent dans la nodulation de la plante (gènes nod) et dans le fonctionnement du nodule avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes nif et fix) (Werner, 1992). Les gènes nod sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes nif et les gènes fix sont regroupés dans 5 régions distinctes.

4.1. Gènes *nod*

Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005).

4.2. Gènes *nif*

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans *Rhizobium* libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy et Nougier, 2005).

4.3. Gènes *fix*

Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crossman, 2004).

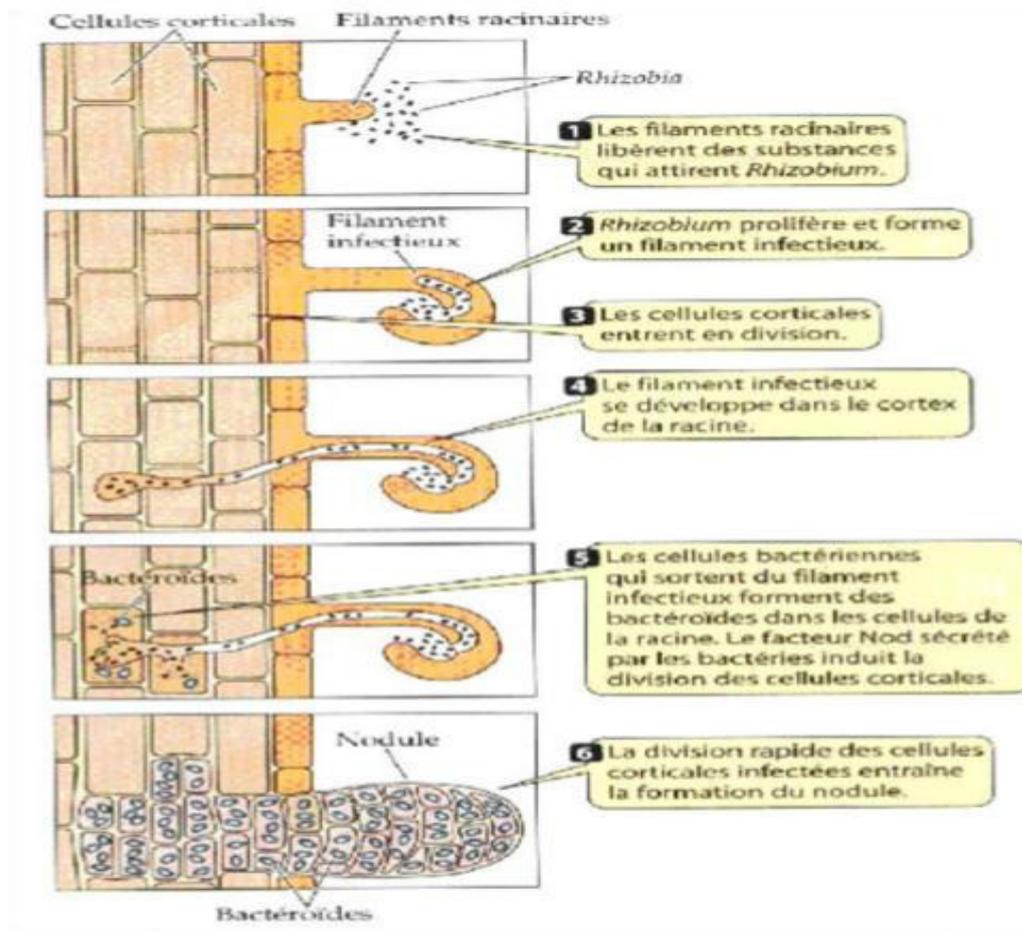


Figure 4 : Les étapes du mécanisme de nodulation (Perry *et al.*, 2004).

4.4. Gènes de la plante hôte

Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005). Ces nodulines sont codées par des gènes nod localisés dans les plasmides bactériens géants (Hopkins, 2003).

4.4.1. Leghémoglobine

La leghémoglobine est une protéine sécrétée par la plante et qui joue un rôle dans le transport de l'oxygène en maintenant une faible pression d'oxygène dans le cytoplasme des cellules

racinaires de la plante pour la phosphorylation oxydative. Elle permet ainsi de réguler la diffusion d'oxygène aux bactéroïdes. L'atmosphère dans l'environnement nodulaire étant alors favorable, la nitrogénase devient active et catalyse la réduction du N_2 en NH_4^+ (Ott et al, 2005).

Matériel

Et Méthodes

1. Matériel végétal et culture des plantes

L'étude a été menée sur une variété de la lentille (*Lens culinaris*, *L.cu.PB Syrie 229*) d'origine locale.

Le site d'expérimentation choisi se situe dans la région de l'exploitation agricole de monsieur ACHOURI N. à Constantine (Massine d'El Khroub) (figure 5).

Les plantes de la lentille ont été cultivées dans 4 champs différents en plein champ. Le semis de graines a été réalisé en décembre 2018. Les cultures ont été conduites jusqu'au stade de la floraison.

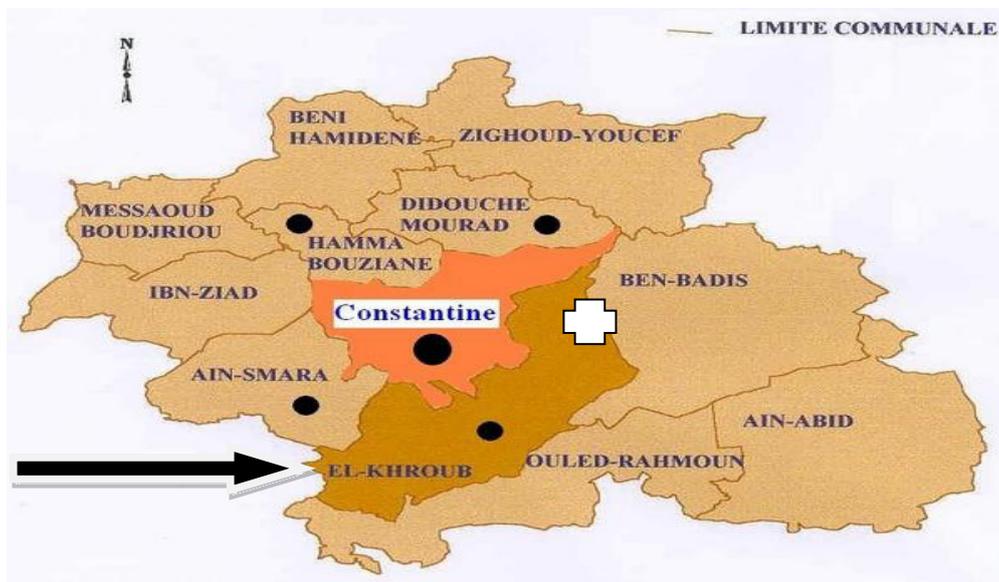


Figure 5 : Localisation géographique montrant le lieu de prélèvement

2. Echantillonnage des plantes

Les plantes dont les racines contiennent des nodules ont été récoltées à partir des différents champs de la même exploitation après 3 mois de croissance (début mars) au stade de la floraison, le prélèvement a été réalisé comme suit :

- Choisir une surface de 2m² dans chaque champ.
- Cinq répétitions de prélèvement sont effectuées (5 points) correspondant à une récolte de sept plantes chacune dans cette surface de 2m² (figure 6).

La collecte des plantes dont les racines contiennent des nodules de couleur rouge brun a été réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970). Cette technique consiste à :

- creuser 10 à 15 cm autour de la plante ainsi que le sol afin d'extraire toute la plante et son appareil racinaire (figure 6).
- creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire ;
- se débarrasser de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules ;
- placer le tout dans un sac en plastique qu'on achemine au laboratoire ;
- au laboratoire, les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet.

Remarque : Pour l'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires, nous avons prélevé 3 plantes de la surface des 2 m² correspondant à chaque champ.

2. Paramètres mesurés

→ La Plante représentative

Choisir une plante représentative de chaque répétition du même champ.

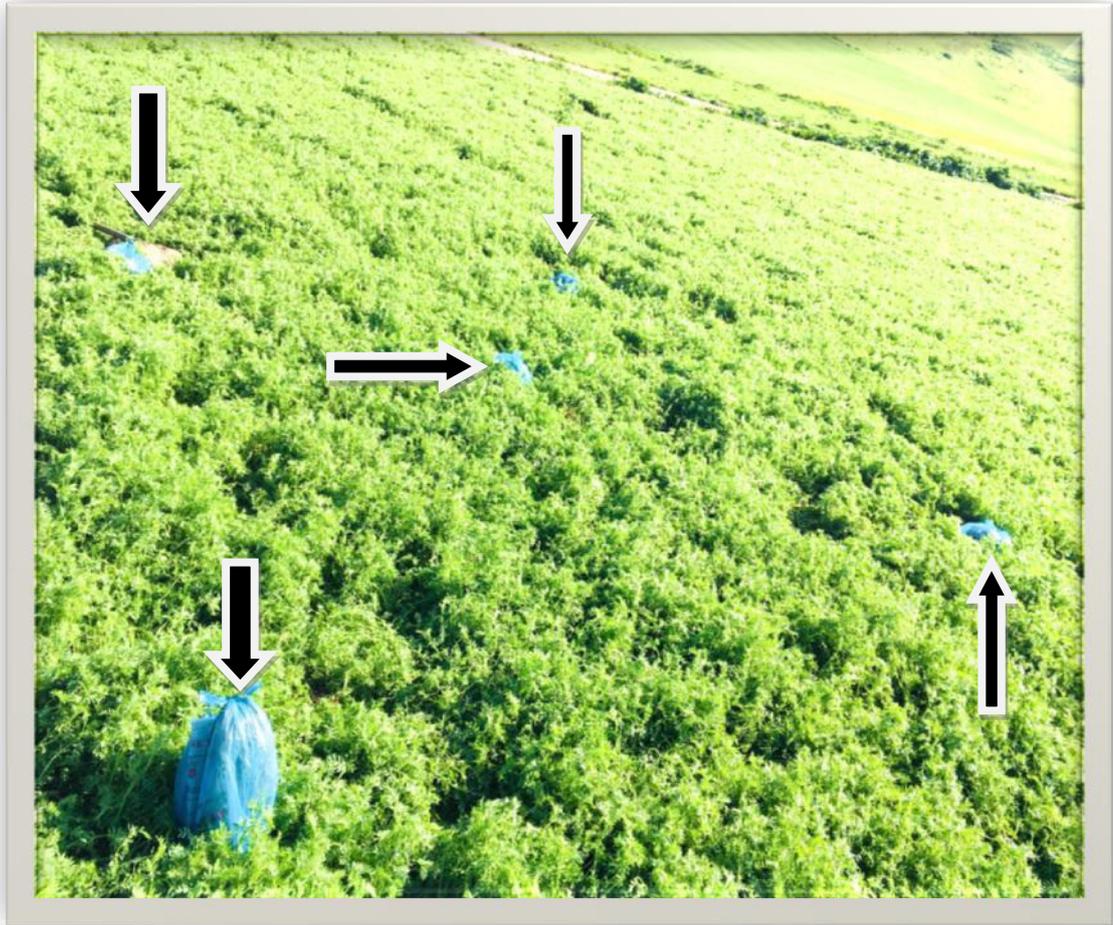
- Séparer la partie aérienne du système racinaire, collecter et dénombrer les nodules indépendamment (figure 7). Par la suite, ces différents compartiments de plante sont séchés au four à 80°C pendant 72 heures afin d'en déterminer le poids sec.

→ Les 6 plantes restantes

- Les parties aériennes sont séparées des systèmes racinaires avec les nodules, puis séchées dans un four Pasteur à 80°C pendant 72 H.

3. Analyse statistique

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2018 (Version XLSTAT 2018.4, www.xlstat.com) pour chacun des 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 5%.



a – les cinq points de prélèvement



a- Système racinaire de la plante



c- la partie aérienne de la plante

Figure 6 : Echantillonnage des plantes



a- Partie aérienne de la plante

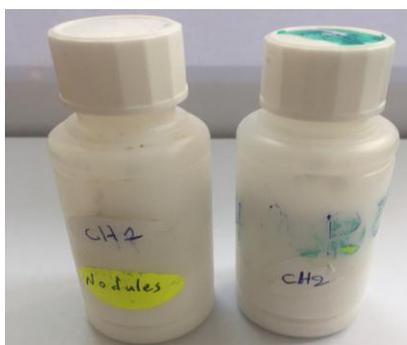
b- système racinaire de la plante

Figure 7 : Parties aériennes, racines, les nodules de la plante représentative

5. Isolement des bactéries à partir des nodules

5.1. Collecte et conservation des nodules

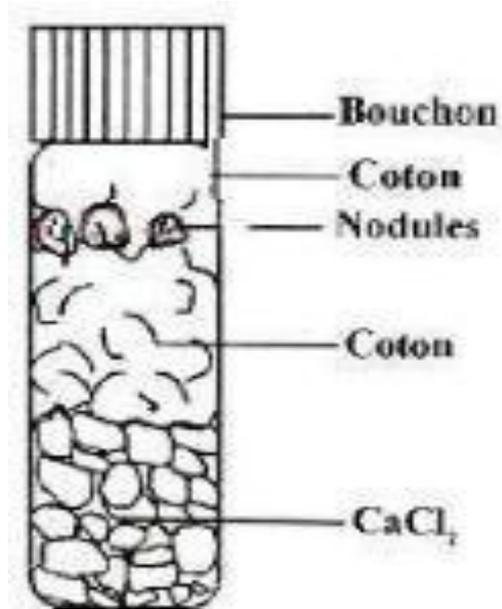
30 nodules racinaires ont été prélevés au hasard à partir des systèmes racinaires des 3 plantes de chaque champ, et ont été déposés sur une couche de coton dans un flacon en verre remplis au quart de son volume par du CaCl_2 et conservés à 4°C (figure 8).



a- Flacon de conservation



b- Nodules conservés



c – les constituants du flacon de conservation

Figure 8 : Conservation des nodules par déshydratation (Vincent, 1970)

5.2. Stérilisation des nodules

Sous la hotte à flux laminaire, Les nodules déshydratés ont été réhydratés dans l'eau distillée pendant une nuit, puis stérilisés par immersion 5 à 10 min dans l'éthanol, ensuite transférés immédiatement dans une solution aqueuse saturée d'hypochlorite de Calcium à 3% pendant 04 minutes. Enfin les nodules sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile

5.3. Ecrasement et isolement des bactéries à partir des nodosités

L'isolement a été réalisé selon la méthode de Vincent (1970) dans des conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire. La procédure suivie est la suivante :

- Dans un tube Eppendorf contenant 2 gouttes d'eau distillée stérile, on dépose un nodule qui sera écrasé à l'aide une pince stérile. Une oëse du broyat est prélevée puis étalée sur différents milieux (annexe 1) :

- Sur milieu YMA + RC (Yeast Mannitol Agar+ Rouge Congo).
- YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar+ Bleu de Bromothymol).
- GPA + BCP (Glucose Peptone Agar + Pourpre de Bromocrésol).

- l'ensemencement est réalisé selon la méthode de stries dans le but d'isoler des simples colonies.

Les boîtesensemencées sont incubées à une température de 28°C pendant 3 jours.

5.4. Purification et conservation des isolats

Après identification des isolats selon leurs caractères morphologiques et culturaux sur les différents milieux sélectifs. Une colonie à purifier est transférée dans un tube à essais contenant 5 ml du milieu YMB (Annexe 1). Après incubation à 28°C dans un bain marie agitateur pendant 48 heures, une oëse du milieu estensemencée sur milieu YMA au rouge Congo. Cette méthode de repiquage peut être répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

Pour une conservation de longue durée, les souches sont cultivées dans du milieu YMB, cette culture bactérienne liquide est mise dans un tube Eppendorf à un volume égal avec du glycérol (w/v) à 20% puis congelée à -20°C.

5.5. Examen microscopique par la coloration de Gram

La coloration de Gram permet de vérifier la pureté de la culture et de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif (Annexe 2).

6. Tests physiologiques

Afin d'évaluer au moins un caractère phénotypique, des tests physiologiques des isolats ont été effectués. Ces tests ont été réalisés à partir d'une culture bactérienne liquide dans du milieu YMB.

6.1. Tolérance au chlorure de Sodium (NaCl)

Les isolats ont été cultivés sur milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl (1%, 2%, 3%, 5%, 10%), puis incubés à 28°C pendant 72h.

6.2. Effet de la température

Les isolats ont été cultivés sur milieu YMA et incubés pendant 72h à différentes températures : 4°C, 28°C, 37°C, 45°C, afin de déterminer la température optimale de croissance et les isolats résistants aux températures élevées. Les boîtes seront incubées selon les températures mentionnées.

6.3. Effet du pH

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA avec différents pH : 4, 5, 6.8, 9, 11, pour la détermination du pH optimal de croissance et la tolérance de certaines aux pH extrêmes. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 72h.

Tableau 1 : différents isolats par champ

Champs	Isolats
Champ 1	Ch14, Ch13
Champ 2	Ch21, Ch22
Champ 3	Ch33, Ch35
Champ 4	Ch43, Ch42

Résultats et discussion

1. Comparaison de la croissance des plantes entre les différents champs

1.1. Croissance des parties aériennes

Une différence significative ($p = 0,014$) sur la croissance des parties aériennes de la lentille est observée entre les différents champs (Figure 9).

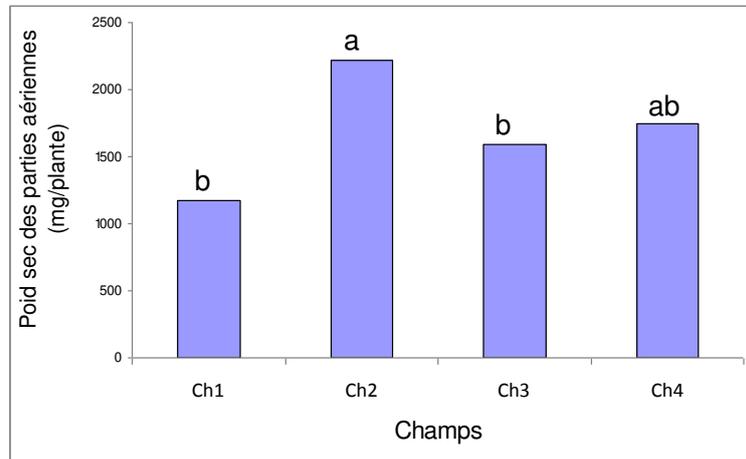


Figure 9 : Développement des parties aériennes de la lentille dans les différents champs. La comparaison de la moyenne entre les différents champs selon le test de Fisher LSD à $P \leq 0,05$ révèle des groupes présentés par des lettres minuscules.

1.2. Effet de la nodulation

1.2.1. Nombre de nodules

On note un effet moindre mais significatif concernant le nombre de nodules par plante ($p = 0.042$). Nous avons remarqué que le nombre de nodules le plus élevé par plante a été enregistré pour le champ 1 (Figure 10).

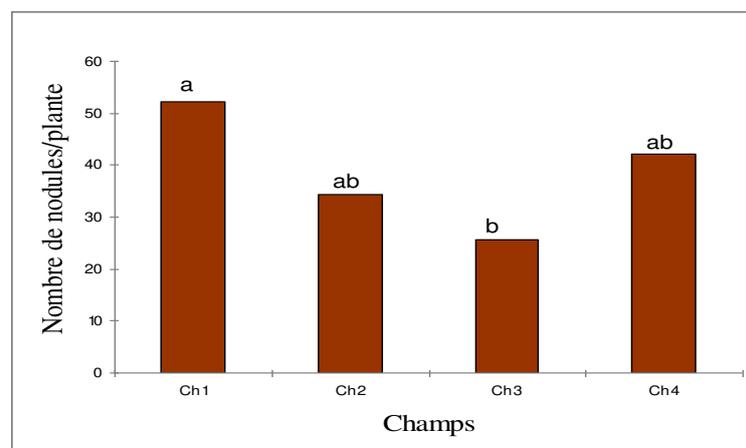


Figure 10 : Variabilité du nombre de nodules dans les champs. La comparaison de la moyenne entre les différents champs selon le test de Fisher LSD à $P \leq 0,05$ révèle des groupes présentés

par des lettres minuscules. Les barres d'histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes.

1.2.2 Masse nodulaire

La masse nodulaire n'a montré aucun effet significatif entre les différents champs ($p = 0,16$).

1.2.3. Taille nodulaire

Un effet très significatif ($p = 0,006$) a été observé concernant le taille nodulaire, ce pendant que la valeur la plus faible n'a été observée que pour le champ 4, alors qu'aucune différence n'a été observé entre les 3 autres champs (Figure 11).

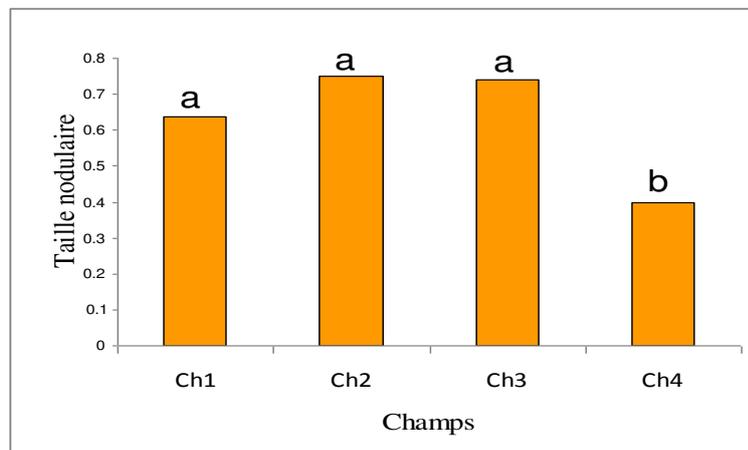


Figure 11 : Variabilité du nombre de nodules dans les champs. La comparaison de la moyenne entre les différents champs selon le test de Fisher LSD à $P \leq 0,05$ révèle des groupes présentés par des lettres minuscules. Les barres suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes.

1. 3. Discussion

Dans cette expérience, il n'a pas été possible de discuter ces résultats car d'autres analyses n'ont pas été réalisées comme l'analyse granulométrique et chimique des différents sols et le dosage de l'azote des parties aériennes. Il a déjà été montré que l'azote peut être un facteur limitant pour le développement des plantes (Bourion *et al.*, 2007).

Le champ 1 montre un faible développement des plantes avec un nombre élevé des nodules. Argaw *et al.*, 2017 ont montré qu'un grand nombre de nodules ne garantit pas toujours l'efficacité de la souche concernée.

2. Caractérisation phénotypique des isolats

2.1. Etude morphologique et culturale

Afin d'identifier les isolats nodulant la lentille, une caractérisation culturale des colonies poussant sur différents milieux sélectifs pour la croissance de rhizobiums a été réalisée.

a) Croissance sur milieu YMA + Bleu De Bromothymol

Après 48h d'incubation, les observations montrent une apparition de colonies avec virage du milieu vers la couleur jaune, cela indique une production d'acide par le bleu de bromothymol, c'est une caractéristique des bactéries à croissance rapide (figure 12). Les bactéries à croissance lente alcalinisent le milieu (Somasegaran et Hoben, 1994).

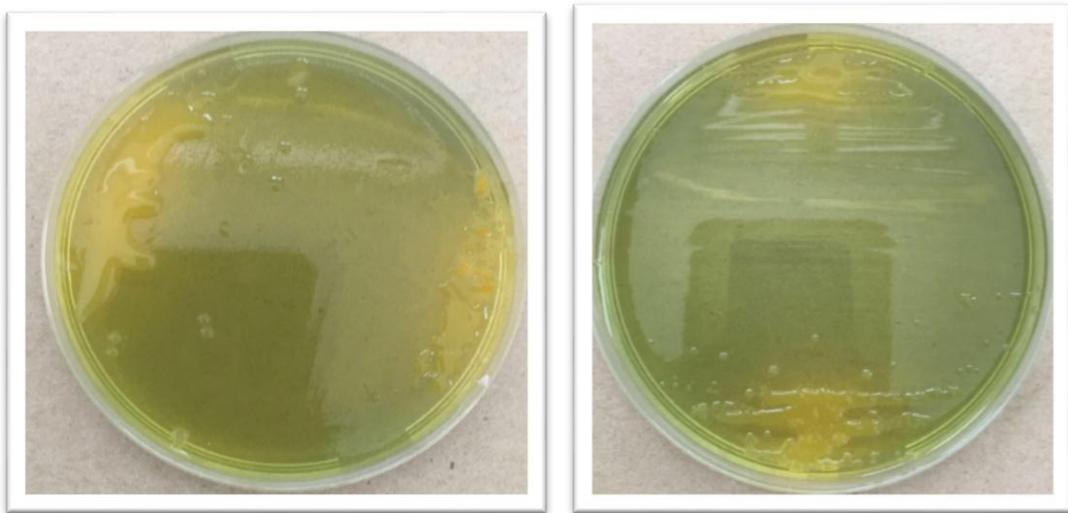


Figure 12 : Croissance des isolats sur milieu YMA + BTB

b) Croissance sur milieu GPA + Pourpre de Bromocrésol

Aucun virage de couleur a été observé, cela indique l'absence de contaminants (figure 13). Ce milieu est utilisé comme indicateur de la pureté des isolats.

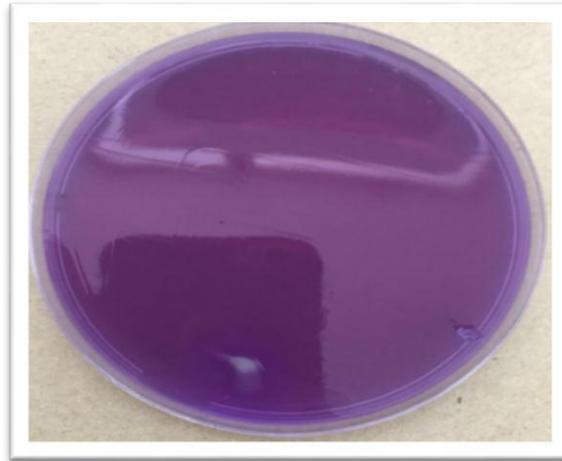


Figure 13 : absence de croissance sur milieu GPA+BCP

c) Croissance sur milieu YMA + Rouge Congo

Nous observant que la couleur des colonies est blanche occasionnellement rose, ce qui prouve que les isolats ont absorbés peu ou pas le rouge Congo qui signifie la pureté des colonies, car en présence des contaminants, les colonies vont absorbés le rouge Congo et deviennent de couleur rouge (figure 14).

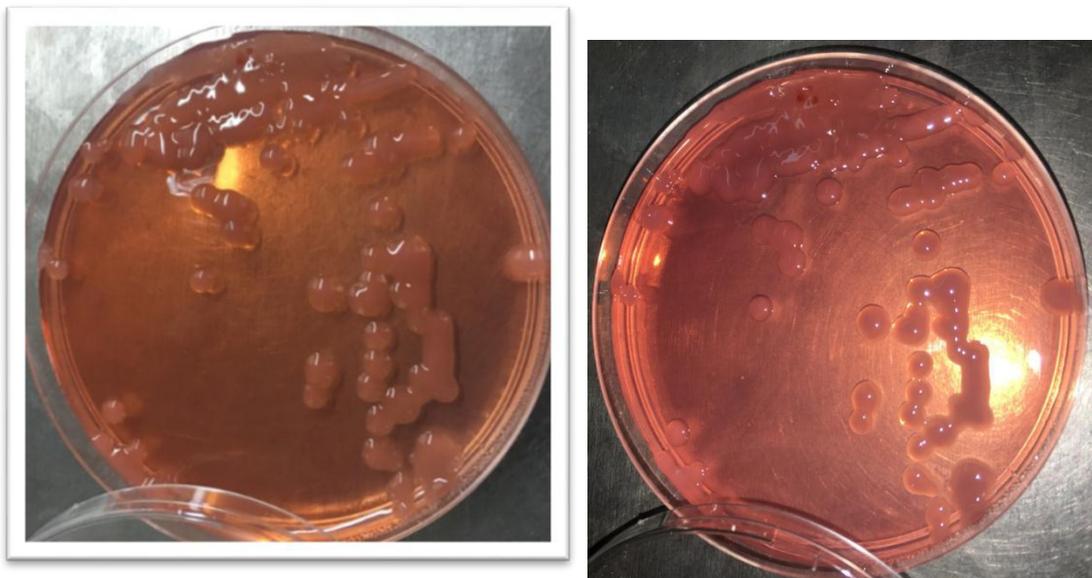


Figure 14 : Croissance sur milieu YMA + Rouge Congo

2.2. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique de nos isolats a permis d'observer des bâtonnets Gram négatif compatible avec la coloration de Gram des rhizobiums (Vincent (1970) (figure 15).

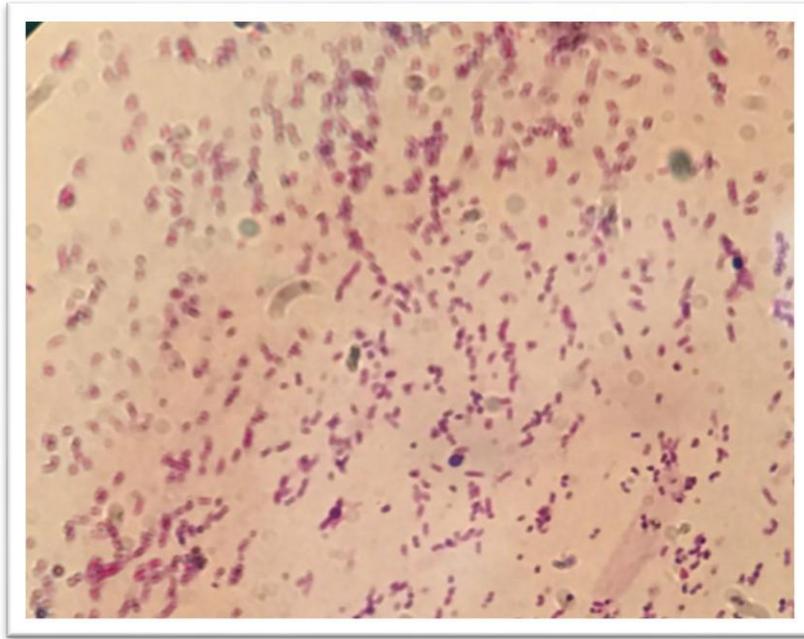


Figure 15 : Aspect microscopique des bactéries à l'aide du microscope optique (Objectif X100)

Les caractéristiques morphologiques, culturelles et microscopique de nos isolats sont en concordance avec ceux observés par d'autres auteurs concernant la caractérisation des rhizobiums (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben,1994). 8 isolats (2 isolats par champ) nodulant la lentille, qui peuvent appartenir au genre *Rhizobium* ont été sélectionnés pour l'application des tests physiologiques. Ces isolats sont présentés dans le tableau 1.

2.3. Tests physiologiques

2.3.1. Tolérance au NaCl :

Nous avons rassemblé dans le tableau 2 les différents résultats du test NaCl, la souche Ch43 a toléré toutes les concentrations de NaCl sauf celle du 10%, alors que les souches

Ch13, Ch21, Ch22, Ch33, Ch42 n'ont pas poussé en présence des différentes concentrations de NaCl. Les souches Ch14 et Ch35 ont présenté une croissance seulement à 1%, 2%, 3% de NaCl (Tableau 2) (Figure 16). Lindström et Lehtomäki (1988) ont rapporté que seulement 3 sur 13 souches de *Rhizobium leguminosarum* ont poussé à 2% de NaCl.

Tableau 2 : Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl

Champs NaCl	1%	2%	3%	5%	10%
Ch13	-	-	-	-	-
Ch14	+	+	+	+	-
Ch21	-	-	-	-	-
Ch22	-	-	-	-	-
Ch35	+	+	+	-	-
Ch33	-	-	-	-	-
Ch43	+++	+++	+++	++	-
Ch42	-	-	-	-	-

+++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Faible Croissance, - : Absence de croissance.

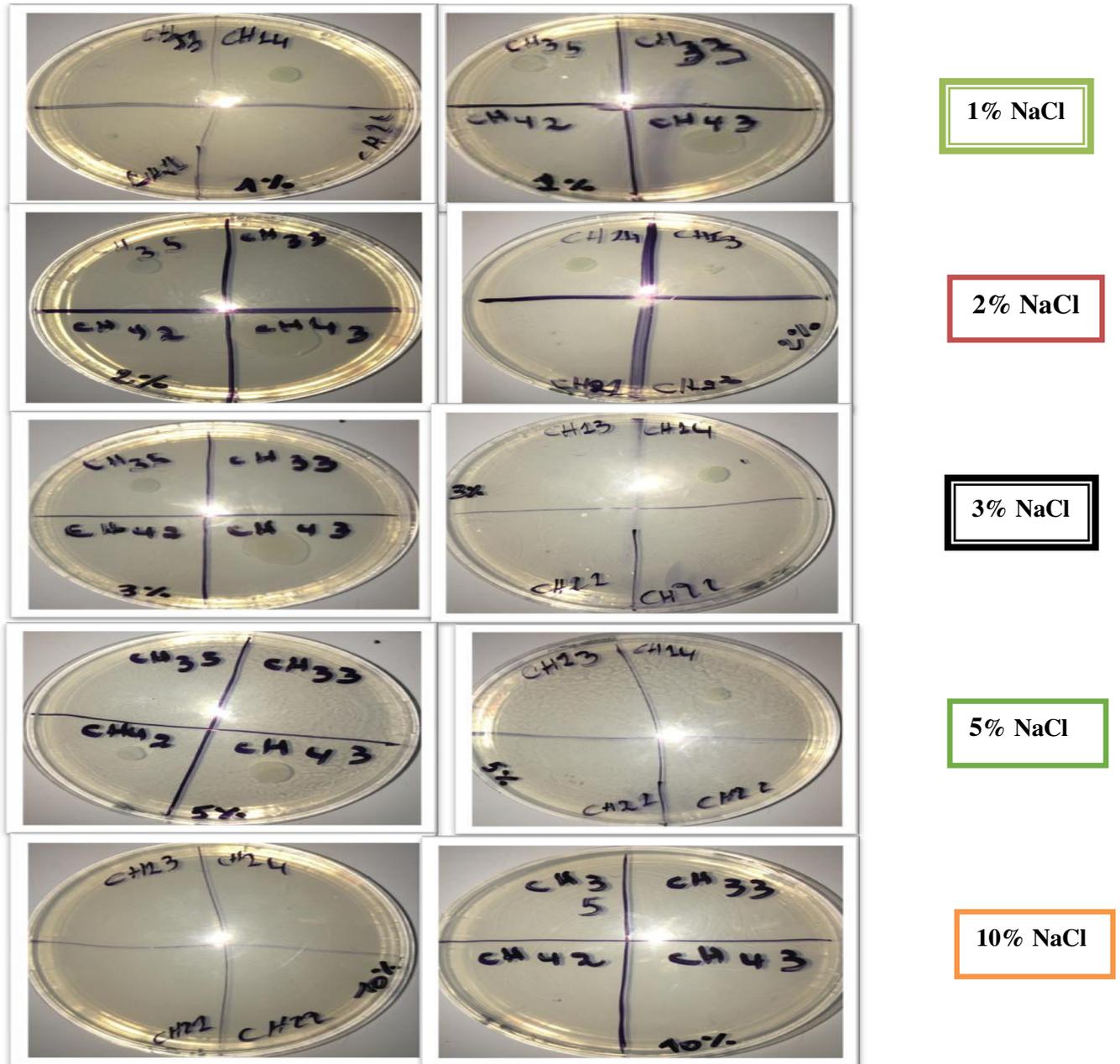


Figure 16 : Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl

2.3.2. Effet de la température

La plupart de nos isolats sont capable de croitre à une température de 28°C, ce qui indique que c'est la température optimale de croissance. Pour la température 4°C et 37°C, seulement la souche Ch43 qui a montré une croissance faible, nous terminons avec la température 45°C, où nous constatons une absence totale de croissance pour toutes les souches (Tableau 3) (Figure 17). Cela indique que nos isolats sont thermo-tolérants.

Graham (1992) a rapporté que les *Rhizobiums* sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est de 28°C.

Les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes alors que les hautes températures engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries (Cloutier et al. 1992).

Tableau 3 : Croissance des isolats sur différentes températures

Champs T°C	4°C	28°C	37°C	45°C
Ch13	-	+++	-	-
Ch14	-	+++	-	-
Ch21	-	+++	+	-
Ch22	-	+++	-	-
Ch35	-	+++	-	-
Ch33	-	+++	-	-
Ch43	+	+++	+	-
Ch42	-	+++	-	-

+++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Faible Croissance, - : Absence de croissance.

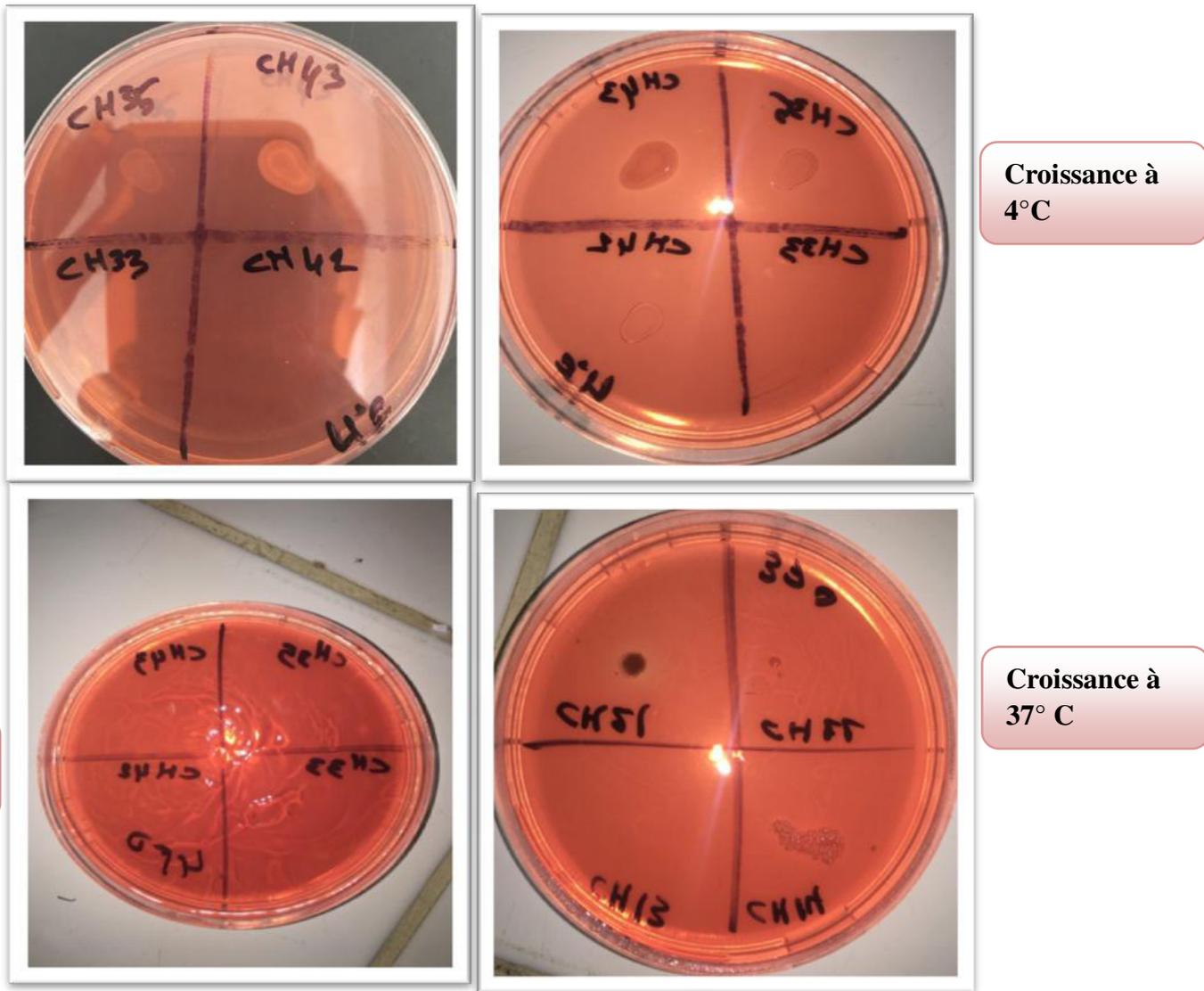


Figure 17 : Croissance des isolats sur différentes températures

2.3.3. Effet du pH

Nos isolats ont été capables de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 4 à 9 (tableau 4). Une variation se présente entre bonne et absence de croissance à pH = 11. Les isolats Ch33 et Ch43 tolèrent une croissance même à pH 11. Un optimum de croissance pour tous les isolats testés est remarqué à pH=6.8 (Figure 18), ceci confirme les constatations de (Vincent 1970) et (Jordan 1984) pour le pH optimum des *rhizobiums*. D'après Graham *et al.*(1994) , peu de *Rhizobiums* poussent à pH <5.

Tableau 4 : Croissance des isolats à différents pH

Champs pH	4	5.5	6.8	9	11
Ch13	++	+++	+++	+++	-
Ch14	++	+++	+++	+++	+
Ch21	+	+++	++	+++	-
Ch22	++	+++	+++	+++	-
Ch35	++	++	+++	++	+
Ch33	++	+++	+++	+++	++
Ch43	+++	+++	+++	+++	++
Ch42	+++	+++	+++	+++	-

+++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Faible Croissance, - : Absence de croissance.

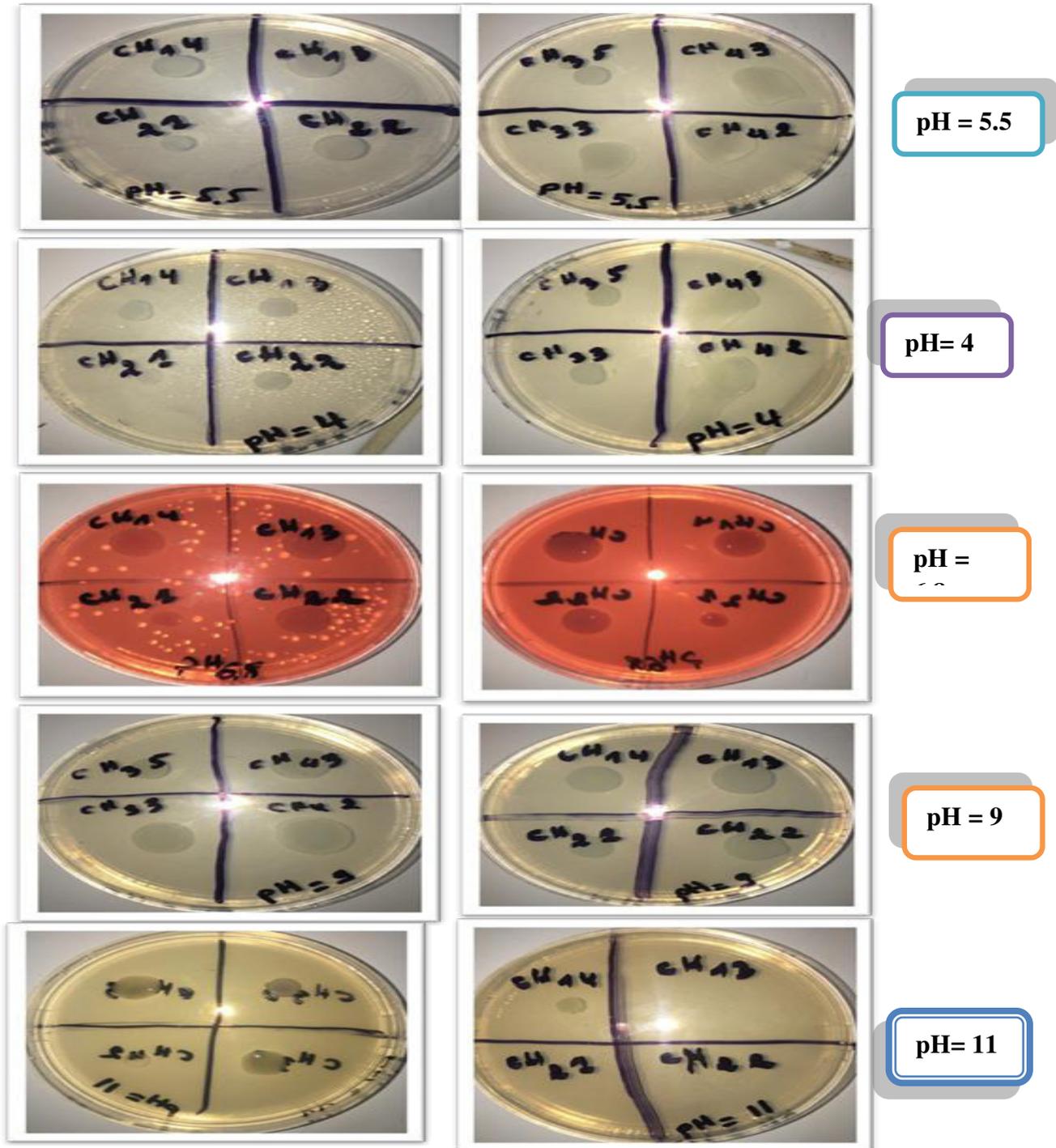


Figure 18 : Croissance des isolats à différents pH

Conclusion

Dans ce travail, nous avons procédé à une caractérisation phénotypique des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la plante de la lentille cultivée (*Lens culinaris*) en plein champ, poussant dans la région Massine d'El Khroub dans la ville de Constantine.

Nous n'avons pas pu déterminer les facteurs responsables de la légère différence du développement des plantes entre les différents champs, et cela par manque de mesure de certains paramètres limitant la croissance des plantes.

Les résultats de l'étude morphologique, culturale après la croissance des isolats sur les différents milieux sélectifs et leur aspect microscopique, nous ont permis de sélectionner 8 isolats qui peuvent appartenir au genre *Rhizobium* selon les caractéristiques soulignées par Vincent (1970) et Jordan (1984).

Concernant les facteurs physiologiques, On marque une variabilité de tolérance au NaCl par nos isolats. La majorité de nos isolats n'ont toléré aucune concentration de NaCl. Une exception pour la souche Ch43 qui a toléré toutes les concentrations de NaCl sauf celle du 10%. Quant à l'effet du pH, certains isolats (Ch33 et Ch43) étaient capables de pousser même à pH 11, mais Un optimum de croissance pour tous les isolats testés est remarqué à pH=6.8. Pour la température, une croissance optimale se manifeste à 28°C, cette dernière est considérée comme étant la température optimale de croissance. La souche Ch43 tolère une température de 37°C.

Enfin, Ce travail devrait être compléter par l'application d'autres tests phénotypiques (biochimiques et nutritionnels) surtout pour l'isolat Ch43, qui tolère une concentration élevée de NaCl (5%), un pH = 11 et une résistance à une température de 37°C. il serait intéressant de compléter cette caractérisation phénotypique par une caractérisation génotypique.

Références

bibliographiques

- Argaw A, Mnalku A. 2017.** Symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from major highland pulses on field pea (*Pisum sativum* L.) in soil with abundant rhizobial population. *Annals of Agrarian Science* **15**: 410–419
- Bala A, Griller KE. 2001.** Symbiotic specificity of tropical three rhizobia for host legumes *New Phytol.* **149**: 495-550.
- Barbault R. 2009.** *Ecologie Générale : structure et fonctionnement de la biosphère*, 5ème édition, (Ed.) Dunod, pp32.
- Bourion V, Laguerre G, Depret G, Voisin AS, Salon C, Duc G. 2007.** Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Annals of Botany* **100**: 589–598.
- Brink M, Belay GKP. 2006.** *Vignasubterranea* (L.) Verdc. Record from Protabase. Brewin N. J., 2002. - Pods and Nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. *Biologist.Rev.* 49 (3).
- Chen W, Wang E, Wang S, Li Y, Chen X, Li Y. 1995.** Characterisation of *Rhizobium trianshanese* sp. nov. Amoderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int.J.Syst. Bacteriol.* **45**: 153–159.
- Cloutier JD, Prévost P, Nadeau, Antoun H. 1992.** Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2846-2853.
- De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989.** Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist.* **111**: 607-619.
- Duhoux E, Nicole M. 2004.** *Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes.* (Ed.) IRD.Montpellier. pp : 1-18.
- Dupuy Y, Nougier P. 2005.** *Les microorganismes. Du gène à la biosphère.* (Ed.) Ellipses. Paris.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* **131**: 900–10.
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. 2005.** Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* **137**: 1228–1235.
- Graham, PH. 1992.** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475–484.
- Graham PH, Draeger k, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Naarons SR, Quinto C. 1994.** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**: 198–207.

Hamadache, A. 2014. Grandes cultures Tome II .Légumineuses alimentaires (pois chiche-fèves-lentille). Vol 2. pp: 103–105

Hopkins WG. 1999. Introduction to plant physiology, second (Ed.) John Wiley and sons, Inc.

Hopkins WG. 2003. Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. (Ed.) de boeck pp: 99–120.

Jordan DC. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938 Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wlkins Co. Baltimore. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). pp: 234–254.

Kennedy IR, Pereg-Gerk LI, Wood C, Deaker R, Gilchrist K, 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**: 65–79.

Lindström K, Lehtomäki S. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *rhizobium* sp. (*Galega*) compared with others fastgrowing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**: 277–287.

Machrafi Y. 2001. Inhibition de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Thèse pour l'obtention du Diplôme de maître des sciences. Université Lava.

Madigan M., Martink J. 2007 : Brock Biologie des microorganismes. Person Education France (Ed.). pp 599-601, 676–681.

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.

Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology.* **15**: 531–535.

Patriarca EJ, Tate R, Ferraioli S, Iaccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol*, pp 62– 201.

Pelmont J. 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. Vol 2. pp : 541–572.

Perry JJ, staley JT, Lory S. 2004. Microbiologie. (Ed.) Dunod, Paris. pp : 633–635.

Pujic P, Normand P. 2009 : La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantesactinorhiziennes. *Biofature.* **298**: 26–29.

Rashid, M. H., Young, J. P. W., Everall, I., Clercx, P., Willems, A., Santhosh Braun, M. and Wink, M. 2015. Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium*

binae sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **65**: 3037–3045

Raven PH, Evert RF, Eichlorn SE. 2000. Biologie végétale. 6ème (Ed.) de boeck , Paris.

Saadallah K, Drevon JJ, et Abdelly C. 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. INRA, EDP Sciences. Agronomie **21**: 627–634.

Saskatchewan PG. 2000. Pulse production manual. Saskatchewan Pulse

Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.

Vincent JM .1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

Weir BS. 2016. The current taxonomy of rhizobia. nz rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

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

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. Systematic and Applied Microbiology. **27**: 380–395.

Annexes

Annexe 1

Milieux de Culture

- **Yeast -Mannitol – Agar (YMA) (Vincent, 1970) en (g/l):**

Mannitol.....	10
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2
NaCl.....	0.1
Extrait de levure.....	0.5
Eau distillée.....	1000
Agar.....	18
pH.....	6.8
Autoclavage à 120 c° pendant 20 minutes	

- **Yeast-Mannitol-Broth (YMB) en (g/l):**

Milieu YMA sans Agar

- **Yeast-Mannitol-Agar + Rouge Congo en (g/l):**

Après ajustement du PH on ajoute 10 ml de la solution de rouge congo (0.25g de rouge congo dans 100ml d'eau distillée) au milieu YMA

- **Yeast-Mannitol-Agar + Bleu de bromothymol en (g/l):**

Après ajustement du PH on ajoute 10 ml de la solution de bleu de bromothymol (0.5g de BTB dans 100ml d'éthanol) au milieu YMA

- **Glucose peptone agar (GPA) +pourpre de bromocrésol (Vincent, 1970) en (g/l)**

Glucose.....	10
Peptone.....	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol.....	10ml
Eau distillée.....	1000ml
Agar.....	18
PH.....	6.8

Autoclavage à 120c° pendant 20 min

Solution stock de pourpre de bromocrésol(1g BCP dans 100ml d'éthanol)

Annexe 2

Coloration de GRAM

Examen microscopique de la coloration de Gram :

On prépare des lames pour la coloration. La préparation est étalée en couche mince sous la hotte, le protocole expérimental consiste à :

- Recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- Rincer avec l'eau distillée.
- Verser sur la lame le lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- Rincer avec l'eau distillée.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone pendant 15sec.
- Laver à l'eau distillée immédiatement.
- Recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute.
- Rincer à l'eau distillée.
- Observer au microscope.(Objectif X100 avec une goutte d'huile à immersion).

Année universitaire : 2017/2018

Présenté par : Achouri Mohamed Anis
Abdi Abdellah
Bendjabeur Merouane

Evaluation de la croissance des plantes de la lentille cultivée en plein champ et caractérisation physiologique de quelques souches nodulant *Lens culinaris*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

Dans cette étude, 8 bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de la lentille (*Lens culinaris*) cultivée en plein champ dans la région Massine d'El Khroub Constantine.

Une légère différence significative concernant le développement des plantes a été repéré entre les différents champs.

La caractérisation morphologique et culturale des isolats a permis de classer nos isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium*.

La caractérisation physiologique des isolats a mis en évidence une température optimale de croissance à 28°C et un pH optimum de 6,8. La majorité des isolats n'ont toléré aucune concentration de NaCl.

L'isolat Ch43 a montré une exception de tolérance élevée aux différents facteurs abiotiques (pH = 11, Température = 37°C et 5% de NaCl).

Mots clés : *Lens culinaris*, *Rhizobium*, caractérisation phénotypique, nodules racinaires, croissance des plantes

Laboratoire de recherche : Laboratoire N°14, Ecologie Microbienne – Département de Microbiologie – Faculté des sciences de la Nature et de la Vie – Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mme. R. Alatou	(MCA - UFM Constantine),
Rapporteur :	Mme. N. Riah	(MCB - UFM Constantine),
Examineur :	Melle. M.Gaci	(MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 27/06/2018