

[Tapez ici]

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTÈRE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Universit Constantine 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie
Filière: Biologie Animale
Spécialité: Génétique des microorganismes

Intitulé:

Étude de la solubilisation du phosphate et effet d'antagonisme des bactéries isolées de la légumineuse *Cicer arietinum*.

Présentée et soutenu par: - Bouabdallah Fatima.
- Laouana Saida.

Le: 23/06/2014

Jury d'évaluation:

Présidente du jury: Mme GHARZOULI R Maitre de conférence B de l'Université Constantine I

Rapporteur: Mme SAOUDI M Maitre de conférence A l'Université de Constantine I

Examinatrice: Mme BECHKRI S Maitre de conférence A de l'Université de Constantine I

Année universitaire

2013/2014

[Tapez ici]



Remerciements



Nous tenons à remercier infiniment Mme SAOUDI Mouna enseignante de l'Université de Constantine I pour l'orientation, confiance et la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu mener au bon port. et pour son aide tout au long de notre période de travail,

Nos remerciements à Mme R. GHARZOULI pour son accord d'accepter de présider notre travail.

Nous remercions Mme S. BACHKRI de nous faire l'honneur de juger ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à l'équipe de laboratoire de microbiologie pour leur aide.

Un grand merci à Mme Ben cheraiet, Mr Zouaghi Faycel pour laide et surtout leur gentillesse.





بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Au nom d'Allah le tous miséricordieux, le très miséricordieux.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

premierement au **DIEU** qui ma dotée la volonté et la patience de compléter ce travail qui représente le fruit de mon effort.

Je me sens particulièrement redevable envers deux personnes les plus chères dans l'existence, mes très chères « Parents », la source de ma joie et d'amour.

A ma mère « **BOURAS RAZIKA** »: symbole d'amour et de sacrifices, qui ma toujours poussée et encouragée pour étudier et être ce que je suis, et de m'avoir fait par de ces critiques toujours précieuses.

A mon père « **Houcin** »: pour sa grande compréhension et sa confiance et pour son aide inoubliable.

Je doit également exprimer toute ma gratitude envers mes frères et ma soeurs

A ma sœurs adorable: « *Bouthaina* ».

A mes très charmants frères: *Sif, Aymen, Mahdi et Islam*.

A mon Binome: « *Laouana Saida* » qui ma beaucoup aidée.

A toute ma grande familles: mes tentes, mes ancles, mes cousines, mes cousins et surtout mes petits anges: « *Mimiya et Batoule* »

A mes belles sœurs: *Nounou, Chahra, Lamis Dalal*.

A mes chères amies: *Fatima, Massi, djalila, Houda, Khawla, Nahla, Salma*.

A toutes mes cousines et surtout: *Sousou, Khawla, Rima, Mouna, Nadia*.

A tout les personnes qui j'aime.

En fin j'espère sincèrement que ce mémoire permettra aux étudiants et aux professeurs de mieux comprendre son but, et qu'il apportera de nouvelles informations en tant qu'ouvrage et référence.

FATIMA





Dédicace

Je dédie ce mémoire aux êtres les plus chères au monde:

A mon chère père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable: tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Que dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi.

A mes frères

Tayeb, Yazid, Samir, Bilal et leurs enfants

A mes très chères sœurs

Salima, Naima et leurs enfants

A mon binôme

Bouabdallah Fatima pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu te protège.

A mes amies

Mes belles et aimables amies Mimi et Soumi je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.

A toutes mes amies qui j'aime: Ahlem, Rima, Fatima, Adila,

A toutes mes camarades de promotion: Massika, Fatima, Houda, Sana, Djalila, Khawla.

A toutes les personnes qui j'aime.

Saida



[Tapez ici]

Liste des tableaux

Tableau 01. Valeur nutritionnelle moyenne pour 100 g.	8
Tableau 02. classification des <i>Rhizobia</i> .	12
Tableau 03. La taxonomie actuelle des Rhizobiums partielle mise à jour: 2 mai 2013 (The current taxonomy of rhizobia Partial Update: 2 May 2013).	12
Tableau 04. les différentes formes des PGPR et leur action sur les mécanismes de croissance des plantes.	15
Tableau 05. les souches étudiées.	32

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Liste des figures

Figure 01. Le cycle de l'azote dans le sol.	3
Figure 02. Le cycle de l'azote. Relation entre les trois principales réserves d'azote: l'atmosphère, le sol et la biomasse.	4
Figure 03. Champ de pois chiche de Massaoud Boudjriou ex Ain Carma (Constantine).	8
Figure 04. Les microorganismes efficaces du sol.	16
Figure 05. Schémas du processus d'infection amenant à la formation des nodules.	17
Figure 06. L'infection et la nodulation.	19
Figure 07. Les deux formes que prend le nodule.	20
Figure 08. <i>nod ABC</i> : gènes de la voie de biosynthèse facteur Nod. <i>nod D</i> : régulateur positif.	23
Figure 09. Différents types de gènes <i>nod</i> .	23
Figure 10. Structure de la nitrogénase.	25
Figure 11. Nitrogénase et mécanismes d'action.	26
Figure 12. pois chiche.	30
Figure 13. Rinçage des racines.	30
Figure 14. conservation des nodules.	31
Figure 15. Boîtes de pétrie contenant le YMA+RC (à gauche). Ensemencement (à droite).	33
Figure 16. Boîtes de pétrie contenant le Pikovskaya (à gauche). Les spots (à droite).	33

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Figure 17. Boîtes de pétri contiennent le milieu de King B.	34
Figure 18. préparaion des jarres.	35
Figure 19. A flacon contient des graines imbibées dans l'ethanol B. boîte de Petri contient des graines stériles	35
Figure 20. graines germées (à gauche). Inoculation des jarres (à droite).	36
Figure 21. Aspect des colonies sur YMA+RC (à gauche), YMA (à droite).	38
Figure 22. Boîtes de pétrie contenant le Pikovskaya.	
Figure 23. Résultat négatif de la croissance mycélienne.	39
Figure 24. Résultat négatif du Test de nodulation.	40

[Tapez ici]

[Tapez ici]

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I: Etude bibliographique	
I: Le cycle de l'azote	3
I.1: Ammonification, nitrification, dénitrification	4
I.2: La fixation de l'azote	5
I.2.1: La fixation industrielle de l'azote	5
I.2.2: La fixation biologique de l'azote	5
I.2.3: Les bactéries fixatrices d'azote	5
II:	Légumineuses
6	
II.1: classification des légumineuses	6
II.2: Le pois chiche	7
II.2.1: Historique et origine	7
II.2.2: Classification	8
II.2.3: Valeur nutritionnelle	8
II.3.	Moisissures
9	toxinogènes
II.3.1.	La
9	Fusariose
II.3.2.	Le
10	Fusarium
III: Le microsymbiont: <i>Rhizobium</i>	10
III.1: Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats	10

[Tapez ici]

[Tapez ici]

III.2: Classification des Rhizobia	11
IV: Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)	14
IV.1: Le Rôle des PGPR	14
IV.2: Utilisation des PGPR	16
V: la nodulation	17
V.1: L'infection	17
V.1.1: Phase de pré-infection	18
V.1.2: Phase de l'infection et de la formation des nodules	18
V.1.3: Phase de fonctionnement ou maturité des nodules	19
V.1.4: Phase de dégénérescence	20
V.2: Structure et morphologie des nodules	20
V.3: Facteurs influençant la formation des nodules	20
V.4: Génétique de la nodulation chez la bactérie	21
V.4.1: Caractères génétiques	21
V.4.2: Les flavonoïdes	21
V.4.3: Les gènes de nodulation	22
V.4.3.1: Gènes nod	22
V.4.3.1.1: Gène nod D	22
V.4.3.1.2: Gènes nod communs (ABCIJ)	24
V.4.3.1.3: Gènes nod spécifiques (nod H, nod FE, nod G, nod MN, nod Q...)	24

[Tapez ici]

[Tapez ici]

V.4.4: Gènes nif	25
V.4.5: Gènes fix	27
V.4.6: Autres gènes nécessaires à la nodulation	27

Chapitre II: Matériels et méthodes

II: Isolement des bactéries à partir des nodules	30
II.1: Collecte des nodules	30
II.2: Conservation des nodules	31
II.3: Stérilisation des nodules	31
II.4: Isolement des souches à partir des nodules	31
II.5: Etude phénotypique des souches	32
II.6: Etude de la solubilisation des phosphates	33
II.7: Test d'antagonisme (annexe 1)	33
III: Test de nodulation (prestations symbiotiques avec la plante-hôte)	34
III.1: Préparation et stérilisation du sable	34
III.2: Préparation des jarres de Léonard (Vincent, 1970)	34
III.3: Stérilisation des graines	35
III.4: Inoculation des jarres	35

Chapitre III: Résultats et Discussion

I: Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats	38
I.1: Croissance des isolats sur YMA, YMA+RG	38
I.2: Etude de la solubilisation des phosphates	38
I.3: teste d'antagonisme	39
I.4: Test de nodulation	39

[Tapez ici]

[Tapez ici]

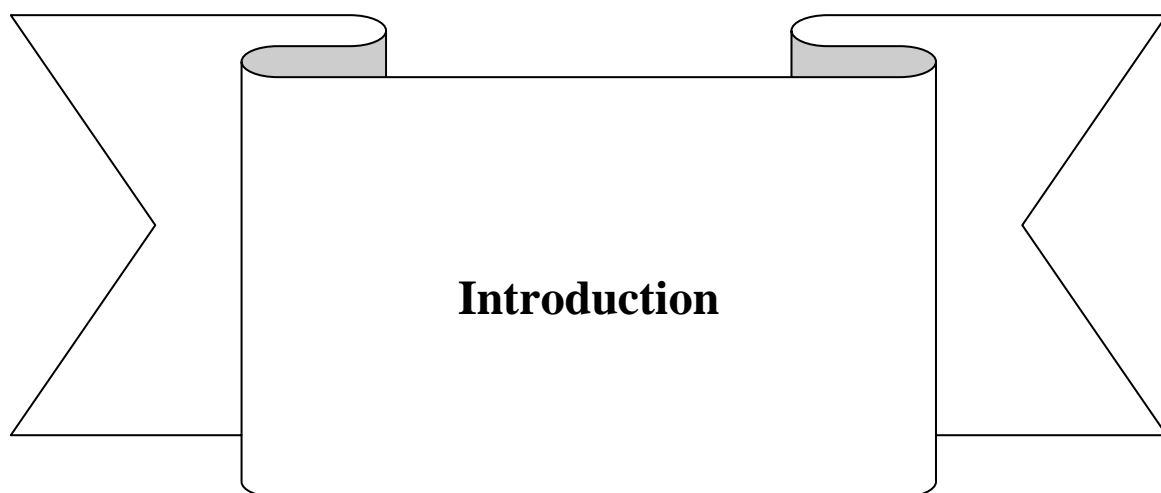
Conclusion général

42

Références bibliographiques

44

Annexes



[Tapez ici]

[Tapez ici]

Introduction

La production végétale et le rendement sont deux critères liés au potentiel de la plante, aussi les conditions environnementales peuvent également contribuer à augmenter cette production (techniques culturales, apport d'engrais,...). Parmi les éléments qui peuvent contribuer à augmenter la production végétale et le rendement chez les légumineuses, la mise à profit de la symbiose légumineuse-Rhizobium à travers l'apport d'inoculum (**Maougal, 2004**).

les rhizobia sont des organismes vivant dans le sol les plus diversifiées et les plus abondants, leurs activités métaboliques sont impliquées dans de nombreux cycles biogéochimiques, incluant des processus de transformation de la matière, des principaux éléments nutritifs des plantes et des matières organiques (cycles du carbone, d'azote, du phosphore...). Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de la limitation en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase. Cette symbiose est indubitablement le facteur majeur expliquant le grand succès de cette famille de plantes en agriculture (**Noel, 2009**).

Parmi les légumineuses, le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) exerce une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec des souches bactériennes du genre *Mesorhizobium* (**Liu et al 2003**).

Des études précédentes sur les bactéries nodulant le pois chiche, ont mis en évidence la présence au niveau des nodules d'une série des bactéries, parmi les quelles le genre *Rahnella*.

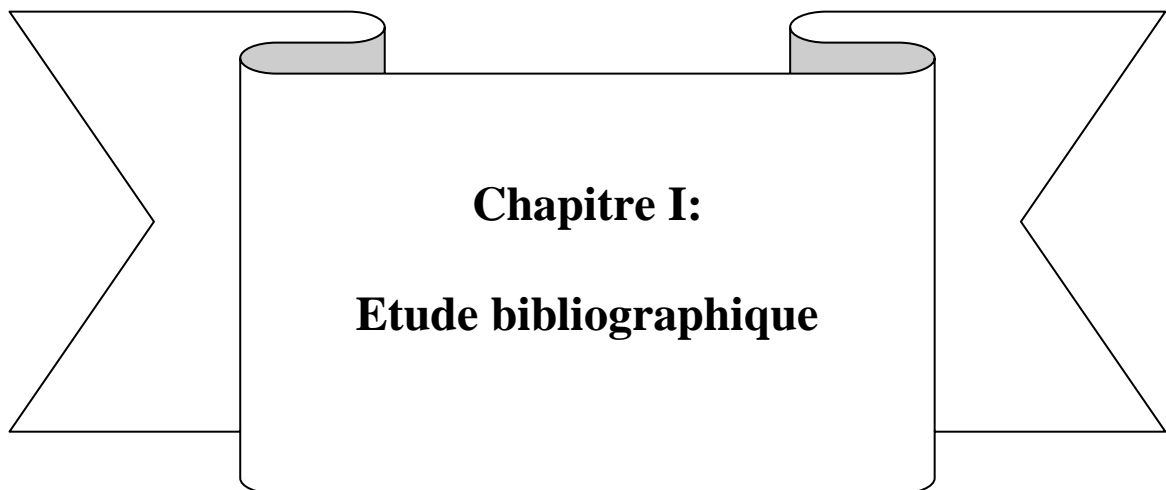
Dans notre objectif on teste certaines activités biologiques de certaines bactéries *Rahnelle aquatilis*.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Tester l'effet de ces bactéries sur la croissance du pois chiche en présence de son symbiote (*Rhizobium*).

Notre travail se propose d'étudier la solubilisation du phosphate et effet d'antagonisme des bactéries isolées de la légumineuse *Cicer arietinum*.



[Tapez ici]

[Tapez ici]

I. Le cycle de l'azote

Par rapport à leur masse de matière sèche, l'azote est le quatrième élément nutritif important des plantes. C'est un constituant essentiel des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes. La plupart des plantes puisent l'essentiel de leur azote dans le sol, soit sous la forme de nitrate (NO_3^-) ou d'ammonium (NH_4^+) (**Fig 01**).

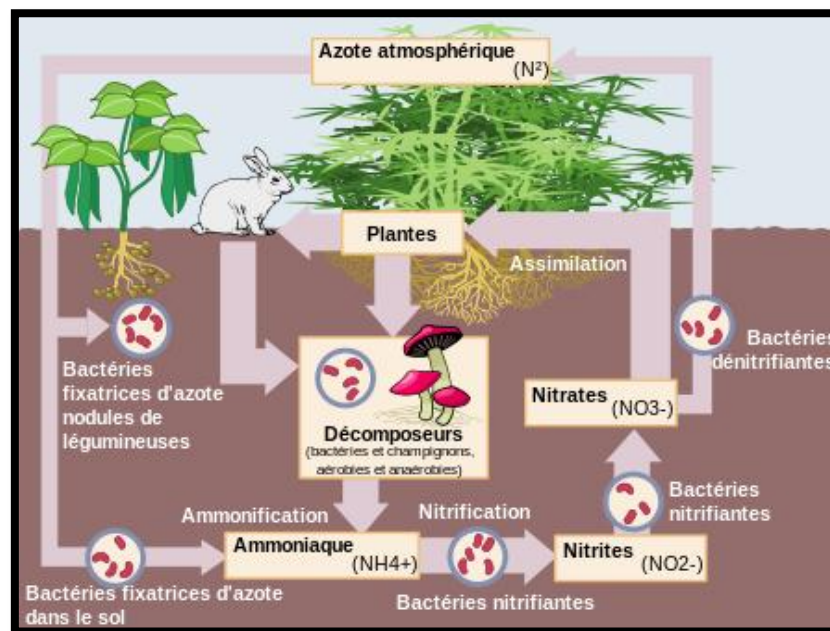


Figure 01. Le cycle de l'azote dans le sol

L'azote total est généralement réparti dans trois ensembles principaux: l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle d'azote. Au centre du concept du cycle de l'azote se trouve l'azote contenu dans le sol. L'azote du sol pénètre dans la biomasse surtout sous la forme de nitrate (NO_3^-) qui est absorbé par les plantes et les microorganismes. Une fois assimilé, l'azote nitrique est converti en azote organique sous la forme d'acides aminés, et d'autres composés azotés qui constitueront les

[Tapez ici]

[Tapez ici]

protéines ainsi que d'autres macromolécules. L'azote continue son chemin dans la chaîne alimentaire, lorsque les animaux mangent les plantes. Puis l'azote retourne au sol sous la forme de déchets animaux, ou lors de la mort et la décomposition des différents organismes (Hopking, 2003).(fig02)

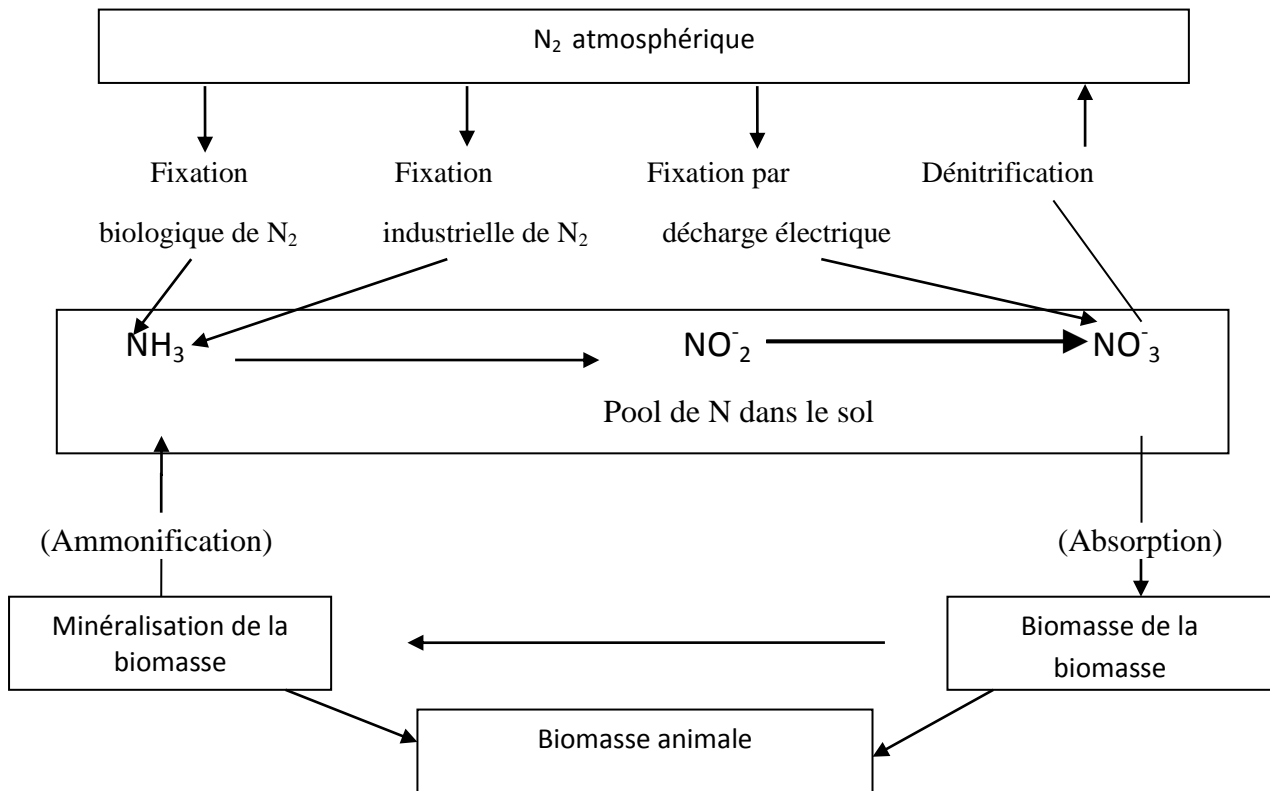


Figure 02. Le cycle de l'azote. Relation entre les trois principales réserves d'azote : l'atmosphère, le sol et la biomasse. (Hopking, 2003).

I.1. Ammonification, nitrification, dénitrification

Au cours de la décomposition, l'azote organique est transformé en ammoniac par une série des microorganismes. Ce processus est connu sous le terme d'ammonification. Une partie de l'ammoniac peut être volatilisé et retourne dans l'atmosphère, mais la plus grande partie est recyclé en nitrate par des bactéries du sol. La première étape de la formation de nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite NO_2^- par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*, Le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres de genre *Nitrobacter*, Ces deux groupes bactérien sont dits bactéries nitrifiantes, le résultat de leur activité est la nitrification. Les bactéries nitrifiantes sont chimioautotrophes; ce qui signifie que l'énergie libérée par l'oxydation des matières inorganiques telles que

[Tapez ici]

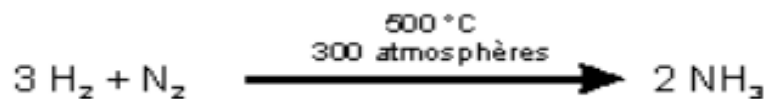
[Tapez ici]

l'ammonium ou le nitrite est utilisée pour convertir le dioxyde de carbone en carbone organique. En prélevant l'azote dans le sol, les plantes entrent en compétition avec des bactéries dites dénitrifiantes (ex: *thiobacillusdenitrificans*). Ces bactéries réduisent le nitrate en diazote, qui retourne à l'atmosphère. Les quantités d'azote qui retournent à l'atmosphère par dénitrification représenteraient de 93 à 190 millions de tonnes par an (**Hopking, 2003**).

I.2. La fixation de l'azote

I.2.1. La fixation industrielle de l'azote

On peut produire de l'engrais azoté à partir de l'azote de l'air par la réaction de Haber-Bosch.



Le dihydrogène est produit à partir de gaz naturel (CH₄). L'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates (ex. nitrate de sodium NaNO₃ ou nitrate d'ammonium NH₄NO₃). Il faut l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par le processus Haber-Bosch. On produit environ 40 millions de tonnes d'ammoniac par le procédé Haber-Bosch par année. C'est environ 1/5 de ce qui est produit par les bactéries fixatrices d'azote sur toute la planète. La moitié de l'engrais ajouté est absorbée par les plantes cultivées. Le reste est absorbé par d'autres plantes ou lessivé (**Saoudi, 2008**).

I.2.2. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine du procaryote.

Les plantes sont des organismes eucaryotes, incapables de fixer le diazote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation d'azote est l'apanage du domaine des procaryotes simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac. Les procaryotes qui fixent l'azote. Nommés fixateur d'azote, comprennent à la fois des organismes libres, et des organismes qui forment des associations symbiotiques avec d'autres organismes (**Hopking, 2003**).

I.2.3. Les bactéries fixatrices d'azote

[Tapez ici]

[Tapez ici]

a) Les fixateurs libres

Il existe des bactéries libres qui vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, soit seules, soit en symbiose avec d'autres bactéries. Ce sont principalement:

- des bactéries aérobies: *Azotobacter*, *Azomonas*.
- des bactéries anaérobies: *Clostridium* ...

b) Les fixateurs symbiotiques

D'autres bactéries vivent en symbiose avec des plantes. Certaines bactéries fixant l'azote vivent en liberté, telles que les bactéries du *Rhizobium*, vivent au sein de nodosités spécialisées sur les racines de légumineuses. La formation de ces nodosités exige une relation génétique intime entre les bactéries et la plante puisqu'on connaît de nombreuses mutations dans leurs génomes respectifs qui peuvent bloquer le développement d'une nodosité fonctionnelle.

c) Autres formes de fixation de l'azote: les orages

Au voisinage des éclairs, les hautes températures et pressions engendrées permettent la formation d'oxydes d'azote qui retombent au sol avec la pluie. Il y a 45 000 orages par jour sur notre planète.

d) Bactéries et Cyanobactéries fixatrices d'azote du sol

Le sol contient de nombreuses espèces de bactéries et de cyanobactéries (appelées aussi algues bleues) pouvant transformer l'azote atmosphérique en ammoniac. Plusieurs de ces microorganismes vivent à la surface des racines des plantes (un environnement appelé la rhizosphère) ou même dans les tissus de certains végétaux (**Saoudi, 2008**).

II. Légumineuses

Les Légumineuses représentent une famille importante et variée des Angiospermes. En effet, il s'agit de la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures avec plus de 720 genres et 20 000 espèces allant des espèces herbacées comme la luzerne, aux arbres composant les forêts tropicales d'Amérique Latine et d'Afrique (**Cronk et al., 2006**), à l'image des acacias. Leurs fruits (gousses) les caractérisent par rapport aux autres végétaux.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

II.1. Classification des légumineuses

Classiquement, les Légumineuses sont divisées en trois sous-familles à savoir les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* (*Faboideae*). La plupart des espèces cultivées appartiennent à la dernière sous-famille. Les *Papilionoideae* représentent la sous-famille la plus diverse avec 429 genres et environ 12 000 espèces. Deux groupes majeurs de plantes cultivées sont présents au sein de cette sous-famille. Il s'agit des légumineuses tempérées encore appelées Galégoïdes, avec les genres *Cicer* (pois chiche), *Lens* (lentilles), *Lotus* (lotier), *Medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilots), *Pisum* (pois), *Trifolium* (trèfle) et *Vicia* (vesce) etc.

Le deuxième groupe est celui des légumineuses tropicales ou Phaséolides, avec les genres *Phaseolus* (haricot), *Glycine* (soja), *Vigna* (vigne) et *Cajanus* (pois d'Angole).

- Les *Caesalpinioideae* (150 genres et 2 200 espèces) sont principalement constituées de plantes ornementales et d'arbres à bois ou alimentaires (*Tamarindus* etc.).
- Quant aux plantes de la sous-famille des *Mimosoideae* (62 genres et environ

2 500 espèces), elles sont présentes principalement dans les forêts tropicales et subtropicales, avec notamment les genres *Acacia* et *Albizia* (Young *et al.*, 2003).

II.2. Le pois chiche

Le pois chiche (*Cicer arietinum*. L) est une espèce diploïde ($2n=16$), annuelle et autofécondée qui produit des graines de grandes dimensions qui sont globuleuse (Burnie *et al.*, 2005).

II.2.1. Historique et origine

Le pois chiche est une plante originaire de l'est de la Méditerranée. L'espèce ancestrale a été identifiée par l'analyse des profils électrophorétiques des protéines et des enzymes.

Cette plante adaptée aux régions semi-arides, elle est probablement originaire des régions de la Palestine et de la Syrie (Moyen-Orient) (Guignard *et al.*, 2005).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

En Algérie, le pois chiche a toujours occupé la deuxième place après la fève, sa culture est située dans l'est, à Skikda, Guelma (zone littoral et sublittoral) à Mila (plains intérieurs), dans l'ouest, à Tlemcen et Sidi Bel Abbas, sa production représente 208785,6 quintaux (dans la période 1990 - 1994) avec un rendement qui demeure assez faible (**Zaghouane, 1997**). (**fig 03**).



Figure 03. Champ de pois chiche de Massaoud Boudjriou ex Ain Carma (Constantine).

II.2.2. Classification

Le pois chiche appartient à (**Saadallah et al., 2001**):

- la famille: Fabaceae.
- sous famille: Papilionoideae.
- Tribu: Cicereae.
- Genre: *Cicer*.

II.2.3. Valeur nutritionnelle

Le pois chiche cultivé pour sa richesse en protéine qui varie entre 20 et 25% et pour sa haute teneur en glucides assimilable, et contient aussi un grande nombre de sels minéraux, jouant un rôle important dans l'alimentation. (**Saadallah et al., 2001**).

Tableau 01. Valeur nutritionnelle moyenne pour 100 g (**Souci et al., 2008**).

Apport énergétique	
Joules	1288 kJ
(Calories)	(305 kcal)

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Principaux composants	
Glucides	44,3 g
Amidon	41,89 g
Sucres	2,41 g
Fibres alimentaires	15,5 g
Protides	18,6 g
Lipides	5,92 g
Eau	8,77 g
Minéraux & Oligo-éléments	
Calcium	124 mg
Chlore	80 mg
Fer	6,1 mg
Magnésium	126 mg
Manganèse	2,7 mg
Phosphore	332 mg
Potassium	800 mg
Sodium	23 mg
Acides aminés	
Arginine	1480 mg
Isoleucine	1140 mg
Leucine	1460 mg
Lysine	1370 mg
Acides gras	
le pois chiche ne contient pas des acides gras	

II.3. Moisissures toxigènes

Parmi les moisissures toxigènes qui contaminent de nombreuses plantes au champ, ces moisissures sont à l'origine de pertes considérables au niveau des récoltes et de la détérioration de la qualité des graines liée à des maladies connues sous le nom Fusariose. (Samapundo *et al.*, 2005).

II.3.1. La Fusariose

La fusariose est une maladie des céréales dites "à petites grains" qui sévit à travers le monde. Sous des conditions climatiques favorables, la fusariose peut attaquer à tous les stades de développement et tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis. Le terme "fusariose" des céréales regroupe trois types de symptômes (Parry *et al.*, 1995):

- "seedling Blight": fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fontes des semis.
- "Foot Rot": fusariose de du collet, entraînant la nécrose de ces tissus.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

- “Head Blight“: fusariose de l’épi (**Goswami et Kistler, 2004**).

L’inconveinant de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l’altération de la qualité des grains (**Pirgozliev et al., 2003**).

II.3.2. Le Fusarium

Les champignons du genre *Fusarium* sont des moisissures filamenteuses qui appartiennent à la classe des ascomycètes et à l’ordre des pyrénomycètes. Ces moisissures sont divisées en deux sections: *Discolor* et *Liseola* (**Laurent, 1998**).

On distingue chez les espèces de *Fusarium* deux modes de reproduction: un mode asexué (anamorphe) conduisant à la production de conidies et ou de chlamydospores et un mode sexué (télémorphe) nécessitant dans la majeure des cas la présence de deux partenaire de types sexuels différents (hétérotallisme) (**Leslie, 1995**).

Fusarium spp peuvent se comporter comme saprophytes lorsque les conditions environnementales ne sont pas propices. En hiver par exemple, *Fusarium spp* sont capables de survivre dans le sol et les débris végétaux ce qui constitue au champ une source de contamination importante (**Schaafsma et al., 2001**). La dissémination des spores par le vent ou les insectes est également une autre voie de contamination (**Sutton, 1982**).

III. Le microsymbiont: *Rhizobium*

La rhizosphère est une entourant les racines des plantes où se déroule toute une série d’interactions entre une plante, des microorganismes (bactéries, champignon, etc.) et le sol lui-même. Cet environnement particulier inclut autant des microorganismes bénéfiques que pathogènes et qui exerce une influence importante sur la croissance et le rendement des cultures végétales. Ainsi, parmi tous les microorganismes de la rhizosphère, les rhizobactéries promotrices de croissance des plantes ou PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) représentent un groupe de bactéries inoffensives qui colonise la rhizosphère et contribue à la santé des plantes (**Abnatura, 2012**).

Les rhizobia furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiées comme agents de la fixation d’azote, c’est Franck 1889 le premier qui a proposé le nom de *Rhizobium*.

III.1. Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Les *Rhizobium* sont des bactéries Gram négatives, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulant (**Jordan, 1984**).

Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (**Werner, 1992**).

Les rhizobiums sont des bactéries chimioorganotrophes; 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. Les rhizobiums à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Les rhizobiums n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer libre (**Pelmont, 1995**).

Le 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 6 et 7, plus exactement 6,8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH=4) comme *Bradyrhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

III.2. Classification des Rhizobia

La combinaison d'étude polyphasique et phylogénétique a permis de modifier considérablement la taxonomie des Rhizobia ces dernières années. Au total, 98 espèces de rhizobia réparties en 13 genres et appartenant aux sous-classes alpha (10 genres) et beta (2 genres) des protéobactéries ont été identifiées depuis 2006. Ces espèces se répartissent également en huit familles (Rhizobiacées, Phyllobactériacées, Bradyrhizobiacées, Hyphomicrobiacées, Methylobactériacées, Brucellacées, Burkholderiacées et Ralstoniacées) et deux ordres, à savoir les Rhizobiales et Burkholderiales. L'ordre des Rhizobiales renferme les six premières familles (**Noel, 2009**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Tableau 02. classification des Rhizobia (Noel, 2009).

<i>Protéobactérie</i>		Espèces		
Division		Nombre	Représentatives	Hôtes Représentatives
Alpha	<i>Rhizobium</i>	16	<i>R.leguminosarum</i> <i>R.etli</i> <i>R.tropici</i>	Psivum, Trifolium etc Phaseolus Phaseolus, leucaena
	<i>Bradrrhizobium</i>	7	<i>B.japonicum</i> <i>B.elkanii</i>	Glycine, Vigna Glycin
	<i>Sinorhizobium(Ensifer)</i>	11	<i>S.eliloti</i> <i>S.fridii</i>	Medicago Glycine, Vigna
	<i>Azorhizobium</i>	2	<i>A.colinodans</i>	Sesbania
	<i>Mezorhizobium</i>	11	<i>M.loti</i>	Lotus spp.
	<i>(Allorhizobium)</i>	1	<i>A.undicola</i>	Neptunia
	<i>Methylobacterium</i>	1	<i>M.nodulans</i>	Crotalaria Spp.
	<i>Divosia</i>	1	<i>D.neptuniae</i>	Neptunia
	<i>Ochrobacterium</i>	1	<i>O.lupinus</i>	Lupinus
	<i>Phylobacterium</i>	1	<i>P.lupinii</i>	Trifolium et Lupinus
Beta	<i>Bukholderia</i>	5	<i>B.phymatum</i>	Mimosa

Tableau 03. La taxonomie actuelle des Rhizobiums partielle mise à jour: 2 mai 2013 (The current taxonomy of rhizobia Partial Update: 2 May 2013).

Le genre *Rhizobium*

<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al., (2009)
<i>Rhizobium alkali soli</i>	Lu et al., (2009 b)
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	Garcia-Fraile et al., (2007)
<i>Rhizobium daejoenense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	Lopez-Lopez et al., (2011)
<i>Rhizobium etli</i>	

[Tapez ici]

[Tapez ici]

<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al., (2011 b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Type species. See note A
<i>Rhizobium loessense</i>	Formerly <i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al., (2009)
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu et al., (2008)
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han et al., (2008)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al., (2008)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Confirmed as a species. Ramirez-Bahena et al., (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al., (2008)
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al., (2009)
<i>Rhizobium sullae</i>	Formerly <i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al., (2011)
<i>Rhizobium undicola</i>	Formerly <i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium vignae</i>	Ren et al., (2011)
<i>Rhizobium yanglingense</i>	

Genre *Mesorhizobium*

<i>Mesorhizobium albiziae</i>	Wang et al., (2007)
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Chen et al., (2010)
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium australicum</i>	Nandasena et al., (2009)
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Chen et al., (2011)

[Tapez ici]

[Tapez ici]

<i>Mesorhizobiumcaranganae</i>	Wang et al., (2007)
<i>Mesorhisobiumchacoense</i>	
<i>Mesorhizobiumciceri</i>	Formerly Rhizobium ciceri
<i>Mesorhizobiumgobiense</i>	Han et al., (2008 b)
<i>Mesorhizobiumhuakuii</i>	Formerly Rhizobium huakuii
<i>Mesorhizobium loti</i>	Formerly Rhizobium loti, Type species
<i>Mesorhizobiummediteraneum</i>	Formerly Rhizobium mediteraneum
<i>Mesorhizobiummetallidurans</i>	Vidal et al., (2009)
<i>Mesorhizobiumopportunistum</i>	Nandasena et al., (2009)
<i>Mesorhizobiumplurifarium</i>	
<i>Mesorhizobiumrobiniae</i>	Zhou et al., (2010)
<i>Mesorhizobiumshangrilense</i>	Lu et al., (2009)
<i>Mesorhizobiumseptentrionale</i>	
<i>Mesorhizobiumtarimense</i>	Han et al., (2008 b)
<i>Mesorhisobiumtemperatum</i>	
<i>Mesorhizobiumtianshanense</i>	Formerly Rhizobium tianshanense

IV. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

Les PGPR sont les bactéries de la rhizosphère qui peuvent améliorer la croissance des plantes par une grande variété de mécanismes tel que la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores, la fixation biologique de l'azote, la production de la rhizosphère désaminase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), la production des phytohormone, présentant une activité antifongique, la production de composés organiques volatils (COV) (Weller *et al.*, 2002; Vessey, 2003).

IV.1. Le Rôle des PGPR

Les bactéries PGPR colonisent la rhizosphère est utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphérique elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via divers mécanismes. Cet effet bénéfique peut être direct, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plant-hôte), ou indirect, lorsqu'elle contrôle des organismes phytoparasites (antagonisme). Au niveau appliqué, l'effet PGPR offre de plus des possibilités intéressantes en agronomie (accroissement du rendement, diminution des intrants azotés

[Tapez ici]

[Tapez ici]

polluants grâce à la phytostimulation, lutte biologique et santé des plantes) (**Dobbelaere et al., 2003**).

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont récemment été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (légumes, pomme, citron, myrtille, Mûre, abricot, framboise, betterave à sucre) (**Esitken et al., 2002**).

Tableau 04. les différentes formes des PGPR et leur action sur les mécanismes de croissance des plantes.

Les formes des PGPR	Définition	Mécanisme d'action	Références
Biofertilisant	Une substance qui contient des microorganismes vivants, lorsqu'elle est appliquée sur la surface de la plante des semences ou le sol, colonise la rhizosphère et promouvoir la croissance des plantes en augmentant le nombre des éléments fertilisants primaires de la plante hôte.	- La fixation biologique d'azote. - Utilisation du phosphore insoluble.	(Vessey, 2003) (Somers et al., 2004)
Phytobénéfique	Micor-organisme, capable de produire des phytohormones indole tels que l'action acétiques, l'acide gibbérellique, les cytokinines et de l'éthylène.	Production phytohormones.	(Lugtenberg et al., 2002) (Somers et al., 2004) (Vessey, 2003)
Biopesticides	Les micor-organisme qui favorisent la croissance des plantes en contrôlant les agents phytopathogènes.	Production d'antibiotiques, sidérophores, HCN production d'enzymes hydrolytiques acquis et systémique induite résistance.	(Somers et al., 2004) (Chandler et al., 2008)

La production des régulateurs de croissance des plantes PGPR peuvent modifier l'architecture des racines des plantes et de promouvoir développement de la production de différents phytohormones comme l'acide gibbérellique et les cytokinines (**Kloepper et al., 2007**). (**fig 04**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

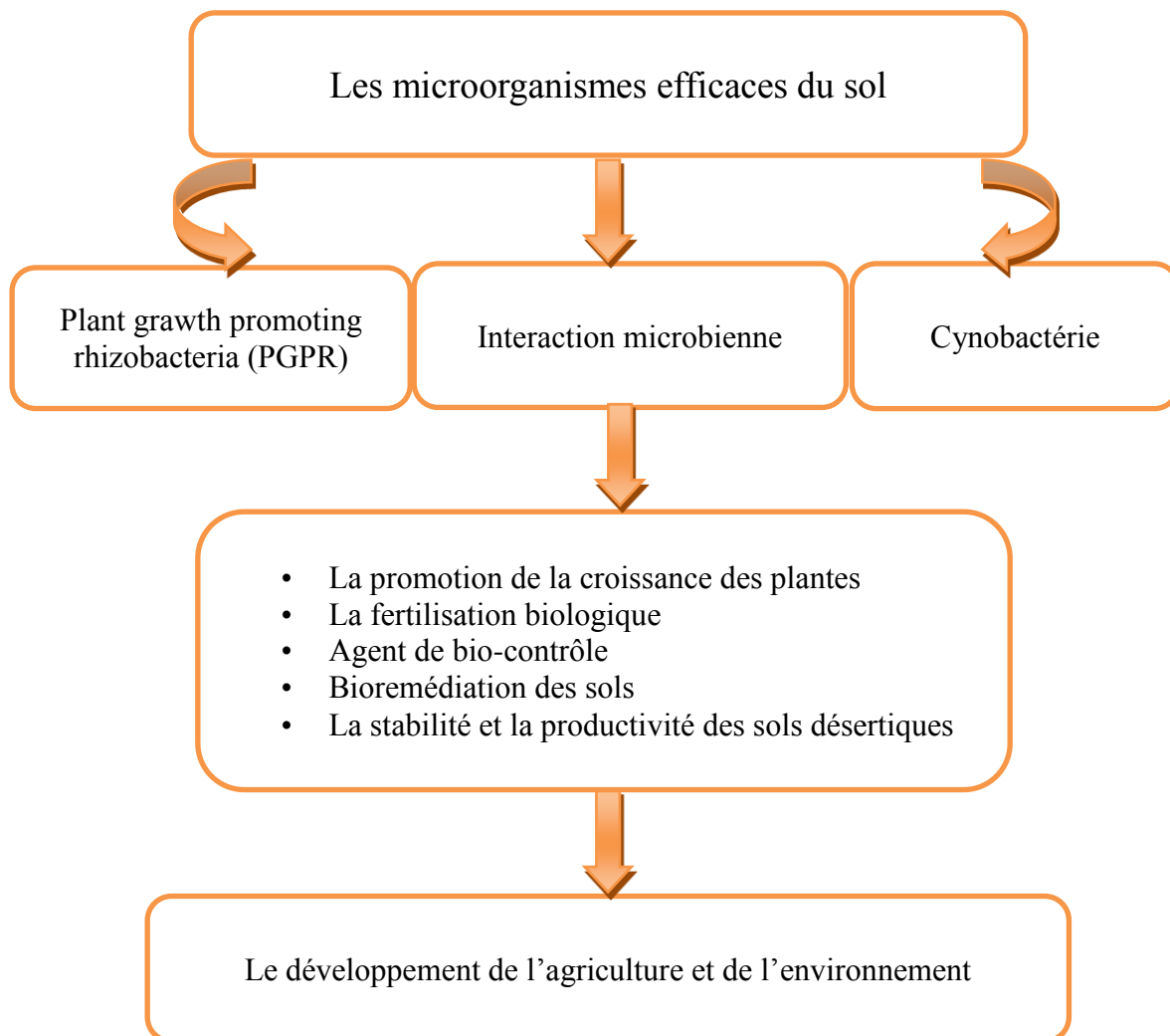


Figure 04. Les microorganismes efficaces du sol (Kloepper *et al.*, 2007).

IV.2. Utilisation des PGPR

Certaines bactéries de la rhizosphère (PGPR, rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes et stimulent les mécanismes de défens chez l'hôte, la plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago, 2005).

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997). L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut être le plus important utilisé

[Tapez ici]

[Tapez ici]

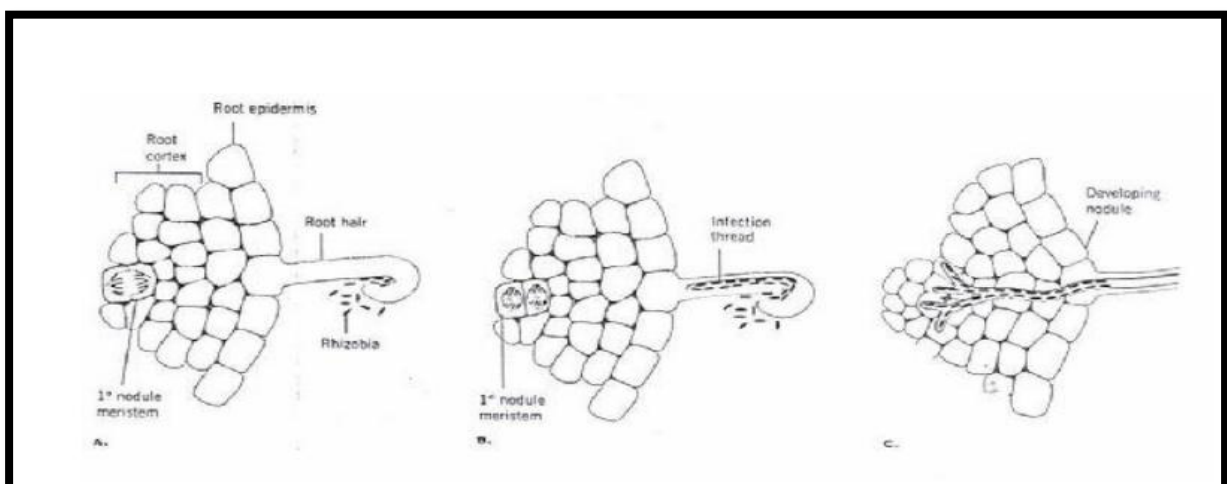
par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ ou antibiotiques. Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants. Des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Peypoux *et al.*, 1999; Bonmatin *et al.*, 2003). Et encore des enzymes hydrolytiques (β - 1,3- gluacanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques. Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolismes qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontré par (Whipps, 2001).

V. la nodulation

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais 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 l'infection (Anonyme e, 2004).

V.1. L'infection

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre étapes majeures: la pré- infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez *et al.*, 1991).(fig 05).



[Tapez ici]

[Tapez ici]

Figure 05. Schémas du processus d'infection amenant à la formation des nodules (Hopkins, 1999).

- A. Les Rhizobia colonisent le sol dans le voisinage des poils absorbants en réponse aux signaux envoyés par les racines; en retour les Rhizobium stimulent les poils absorbants afin qu'ils se recourbent.
 - B. Les Rhizobia envahissent les racines et forment le cordon d'infection.
 - C. Le cordon d'infection pénètre de nombreuses cellules corticales pour former le nodule.
- La dernière étape (non représenté) est la libération des Rhizobia.

V.1.1. Phase de pré-infection

Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre de bactéries au niveau de la racine (Richter, 1993).

Les légumineuses stimulent les *Rhizobium* dans leur rhizosphère par sécrétion de flavonoïdes qui activent les facteurs Nod déclenchant ainsi la transcription des gènes de nodulation. Il s'ensuit que le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de surface de la paroi. La déformation des poils absorbants de la plante est due à l'action d'auxines végétales (Hopkins, 1999).

V.1.2. Phase de l'infection et de la formation des nodules

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme dehors, dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux. (fig 06).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

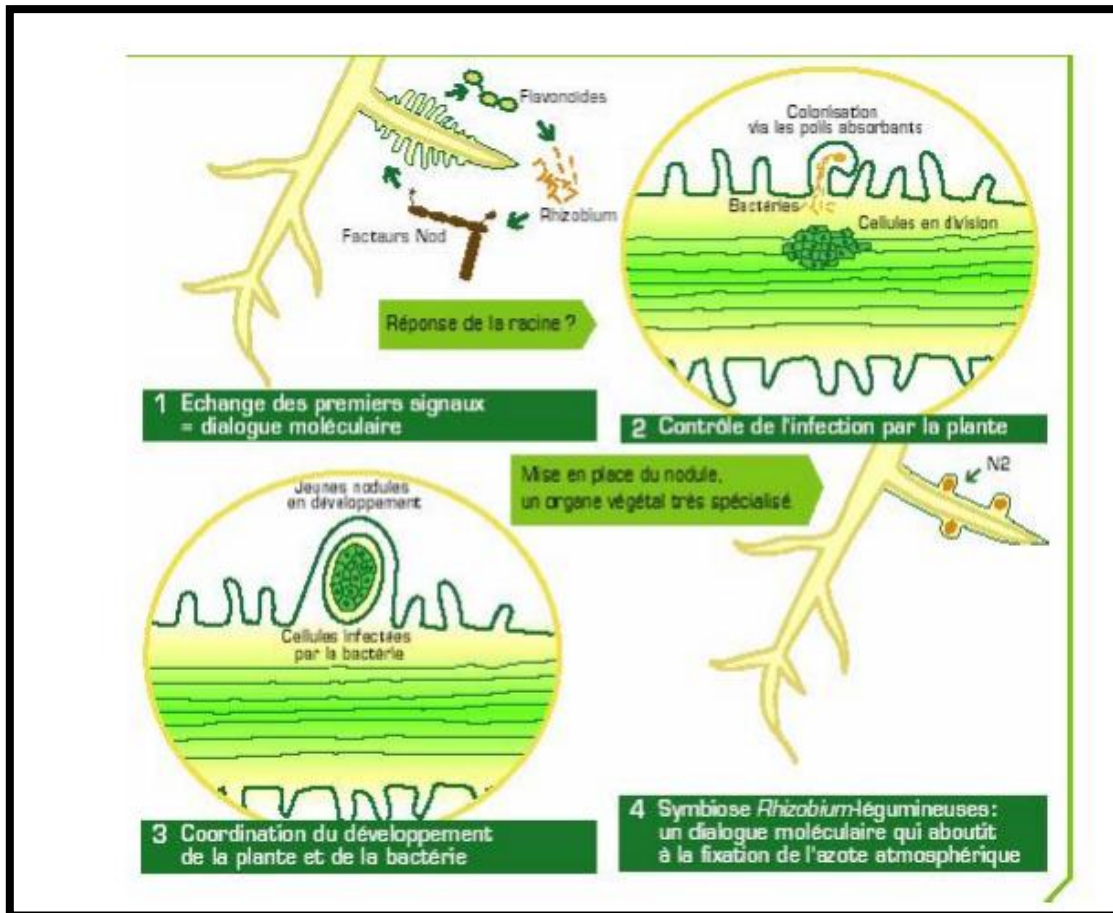


Figure 06. L'infection et la nodulation (Journet, 2004).

Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (Hopkins, 1999).

V.1.3. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules

Les nodosités se forment par multiplication des cellules infectées. Les *Rhizobium* prennent la forme bactéroïdes, entourés par une membrane péribactéroïdienne, après leur libération du cordon d'infection (Hopkins, 1999). La membrane péribactéroïdienne a pour rôle la stabilité du système hôte/symbiose; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte (Richter, 1993).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

V.1.4. Phase de dégénérescence

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol (**Richter, 1993**).

V.2. Structure et morphologie des nodules

Le nodule achevé peut prendre deux formes: soit cylindrique, soit sphérique. Ils subissent une étonnante différenciation morphologique: centrale, les cellules dépourvues de symbiotes forment vers l'extérieur une sorte de tissu cortical; des faisceaux d'éléments conducteurs sont reliés à un faisceau conducteur central de la racine. A l'exception de ces zones de différenciations particulières, lors de symbiose efficace, la plupart des cellules du nodule sont remplies de bactéroïdes (**Richter, 1993; Trevaskis et al., 2002**). (fig 07).

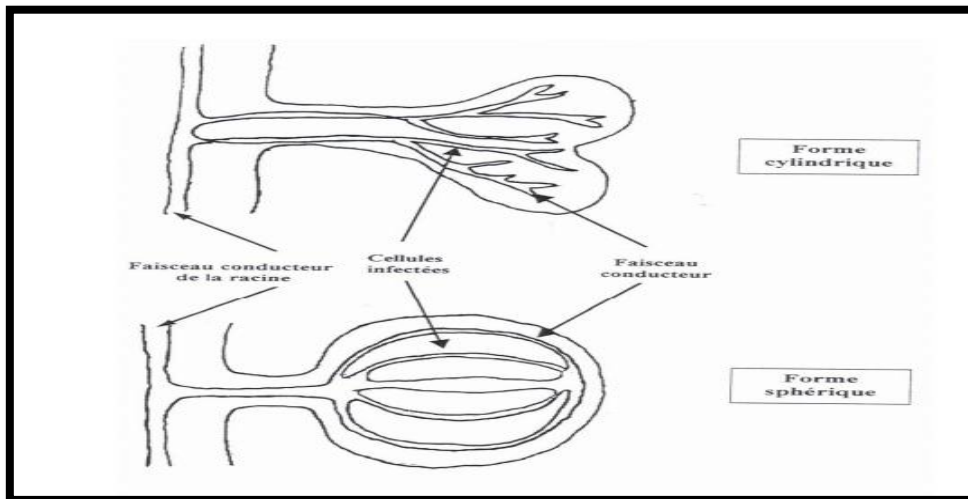


Figure 07. Les deux formes que prend le nodule (**Richter, 1993**).

V.3. Facteurs influençant la formation des nodules

L'organogenèse des nodosités dépend de la condition physiologique de la plante, par exemple la croissance sous limitation de l'azote combiné. En plus, les hormones végétales, agissent comme des facteurs généraux du contrôle de la division cellulaire et de la différenciation tissulaire (**Richter, 1993**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

V.4. Génétique de la nodulation chez la bactérie

V.4.1. Caractères génétiques

La génétique du *Rhizobium* n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (**Pelmont, 1995**).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un mégaplasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon les espèces (**Laranjo et al., 2002**).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (P_{sym}) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti*. Les gènes responsables de la nodulation (Nod) et de la fixation de l'azote (Fix, Nif) sont situés sur ce simple réplicon symbiotique, des gènes codent pour des bactériocines et de la production des pigments sont aussi présent (**Werner, 1992; Pelmont, 1995; Patricia et al., 1998**).

L'existence de séquence répétitive d'ADN est une caractéristique du génome de *Rhizobium*. Elles peuvent fournir des emplacements pour la recombinaison et des réarrangements génomiques ainsi des délétions d'ADN, ayant pour résultat la perte ou des changements des propriétés symbiotiques (**Patricia et al., 1998**).

V.4.2. Les flavonoïdes

Ils se trouvent chez les végétaux, où ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les *Rhizobium*. 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. Ces LPS ont une structure antigénique spécifique, reconnue par la plante, la bactérie peut lyser la paroi de la cellule végétale et s'y introduire. Il y a formation d'un cordon infectieux, qui se ramifie au fur et à mesure de son passage dans d'autres cellules végétales. Dans le cytoplasme, les bactéries ne sont pas libres, elles sont regroupées dans des vésicules de séquestration. Si la cellule est diploïde, elle se nécrose et meurt. Si elle est tétraploïde en revanche, il y a formation d'un nodule (**Saoudi, 2008**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

V.4.3. Les gènes de nodulation

En général, trois types de gènes symbiotiques interviennent dans le processus de nodulation et de fixation azotée chez la bactérie. Il s'agit des gènes *nod* nécessaires à la nodulation, des gènes *nif* codant pour la nitrogénase et des gènes *fix* indispensables pour la fixation de l'azote. Chez la plupart des rhizobia (*Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* etc.), ces gènes symbiotiques sont situés sur un grand plasmide symbiotique appelé P_{sym} (Mercado-Blanco et Toro, 1996; Noel, 2009).

V.4.3.1. Gènes nod

Les gènes de nodulation ou gènes *nod* incluent des gènes communs et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) (Broughton *et al.*, 2000; Spaink, 2000). En 2000, au total 13 gènes de nodulation étaient déjà connus. Il s'agit des opérons *nod* ABCIJ, *nod* FEL, *nod* MNT, du *nod* O et du *nod* D (Perret *et al.*, 2000).

V.4.3.1.1. Gène nod D

Les flavonoides compatibles activent la protéine Nod D, qui est un senseur de l'environnement et un activateur des gènes *nod*. Les protéines Nod D synthétisées vont se lier à la nod-box, lieu de régulation des gènes *nod* A, B et C. Avec la coopération des flavonoides, les protéines Nod D vont pouvoir promouvoir l'expression des gènes *nod* A, B et C: les protéines Nod D ont un site de liaison pour les flavonoides ; une fois les flavonoides liées aux protéines Nod D, ces dernières, liées à la nod-box, sont capable d'induire la transcription de ces gènes. La 20 polymérase se fixe sur le promoteur de ces gènes, ces derniers sont transcrits, et les protéines Nod A, B et C sont traduites (Saoudi, 2008). (fig 08).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

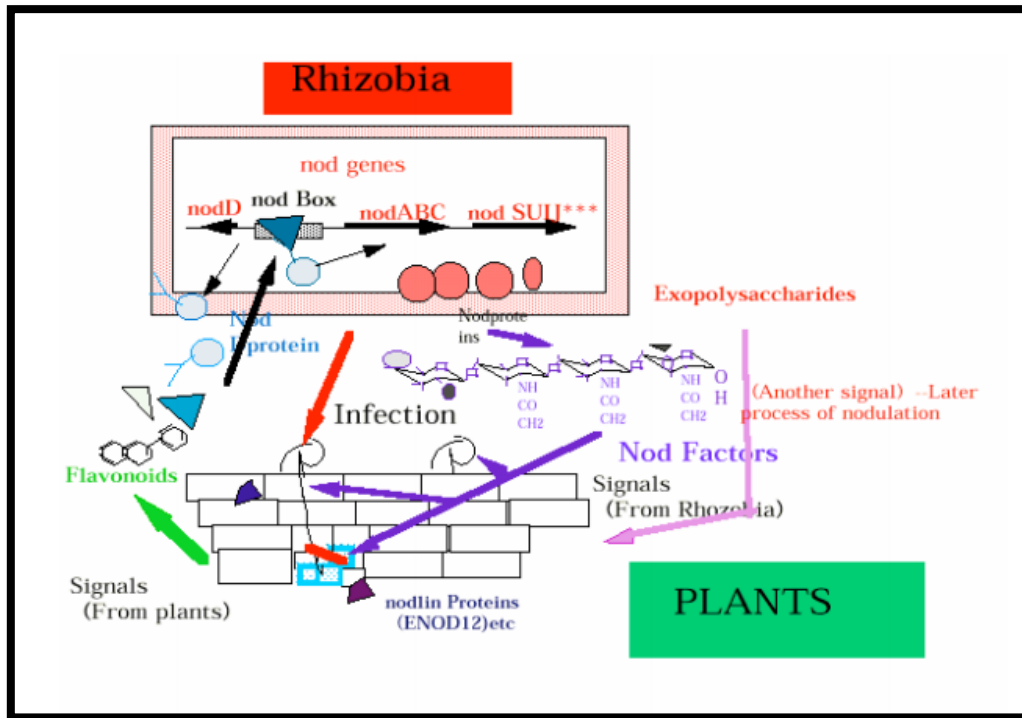


Figure 08. *nod ABC*: gènes de la voie de biosynthèse facteur Nod.
nod D: régulateur positif.

La figure ci-après illustre ce rôle régulateur du Nod D et présente les autres gènes de nodulation. (Fig 09).

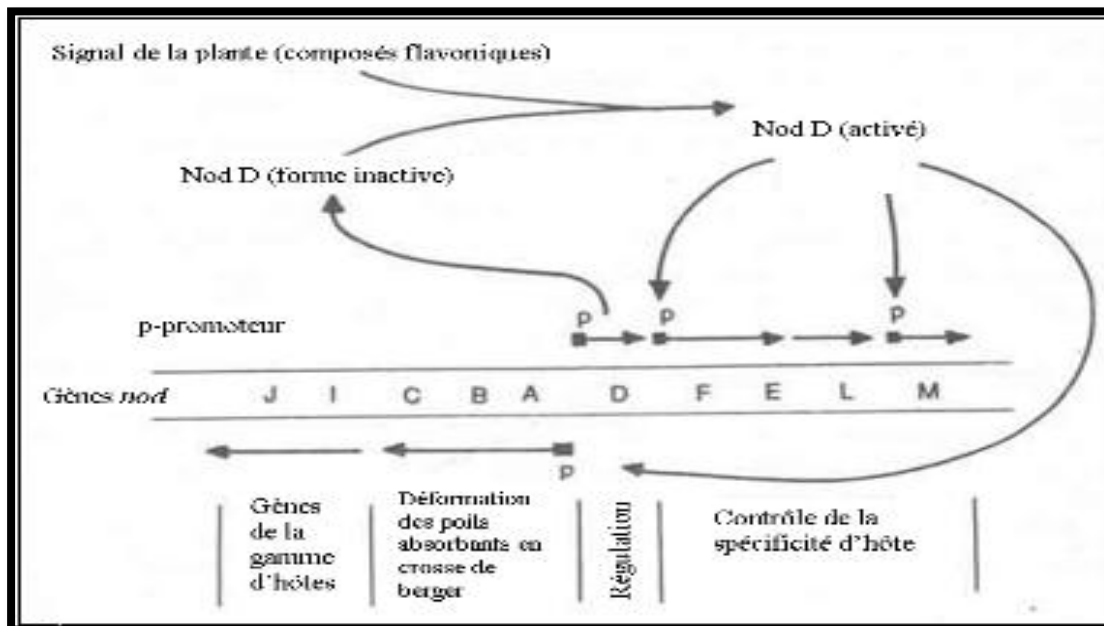


Figure 09. Différents types de gènes *nod* (Anonyme, 2010).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

V.4.3.1.2. Gènes nod communs (ABCIJ)

Les gènes *nod* communs (*nod A, B, C, I et J*) sont des gènes de nodulation communs à tous les rhizobia jusqu'ici étudiés. Ils sont situés sur un opéron duquel les *nod ABC* sont essentiels pour la nodulation. Ces derniers sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces de rhizobia et leurs mutations provoquent une perte complète de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes. En effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (*curling*) et inciter les cellules végétales à se diviser (**Brewin *et al.*, 1992; Pelmont, 1995**).

V.4.3.1.3. Gènes nod spécifiques (nod H, nod FE, nod G, nod MN, nod Q...)

Les gènes *hsn* (*host specific nodulation*) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter (**Pelmont, 1995**). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (**Sharma *et al.*, 1993**). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (**Davet, 1996**). Leur mutation provoque un retard, une réduction de la nodulation ou une modification de leur spécificité d'hôte (**Debelle et Sharma, 1986; Debelle *et al.*, 1986**).

Après leur transcription, les gènes *nod* produisent des enzymes qui contrôlent la synthèse de molécules indispensables au processus de nodulation. Ces signaux, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod, sont des molécules lipo-chito-oligosaccharidiques (LCOs) (**Terefework, 2002**).

La synthèse du noyau lipooligosaccharide de ces molécules est contrôlée par les gènes *nod ABCD* tandis que les gènes *hsn* assurent les diverses substitutions de celles-ci. Les facteurs Nod sont responsables de la spécificité de la reconnaissance entre les symbiotes et du déclenchement de l'organogenèse nodulaire. En effet, même émis à des concentrations minimales, ces signaux peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial. L'identification du signal Nod est une étape essentielle dans l'établissement du dialogue moléculaire à l'origine de la symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (**Debelle *et al.*, 2001**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]

V.4.4. Gènes *nif*

Les gènes *nif* existent chez plusieurs bactéries dont les rhizobia (Young et Haukka, 1996).

Chez ces derniers, ces gènes codent pour la synthèse d'un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote et connu sous le nom de nitrogénase ou dinitrogénase (Hopkins, 2003). (fig 10).

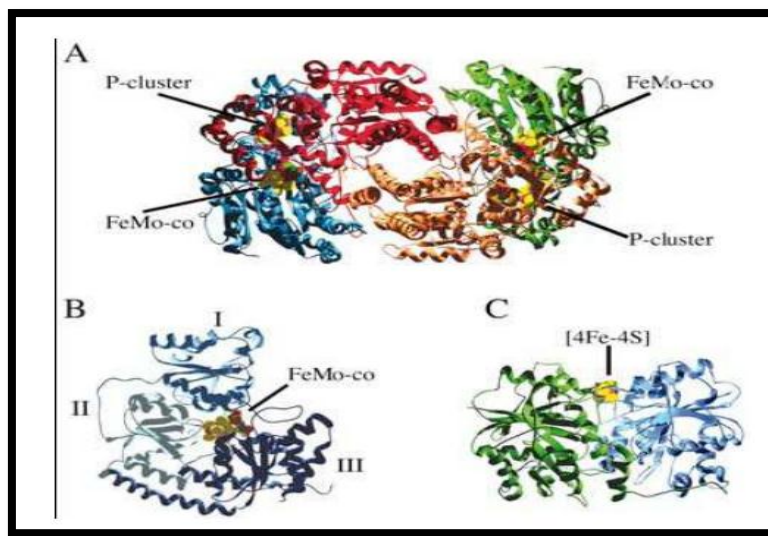


Figure 10. Structure de la nitrogénase.

Le complexe nitrogénase catalyse la réaction de fixation de l'azote atmosphérique. Elle est constituée de deux composants: le composant I est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités représentées en bleu et vert et deux sous-unités représentées en rouge et orange (A), le détail de la sous-unité est donné (B) et le composant II est un homodimère (C). D'après (Rubio et Ludden, 2005).

Ce complexe enzymatique est constitué de deux métalloprotéines de tailles différentes, le site de la réduction du substrat correspondant à la MoFe-protéine ou dinitrogénase (245 KDa) et le donneur d'électrons correspondant à la Fe-protéine ou dinitrogénase réductase (64 KDa).

La Fe-protéine est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques codé par le gène *nif* H. Quant à la Mo-Fe-protéine, elle est un tétramère composée de deux sous unités non

[Tapez ici]

[Tapez ici]

identiques de type $\alpha_2\beta_2$ (Werner, 1992; Hopkins, 2003). Celle-ci est codée par les gènes *nif*
D et *nif* K.(fig 11).

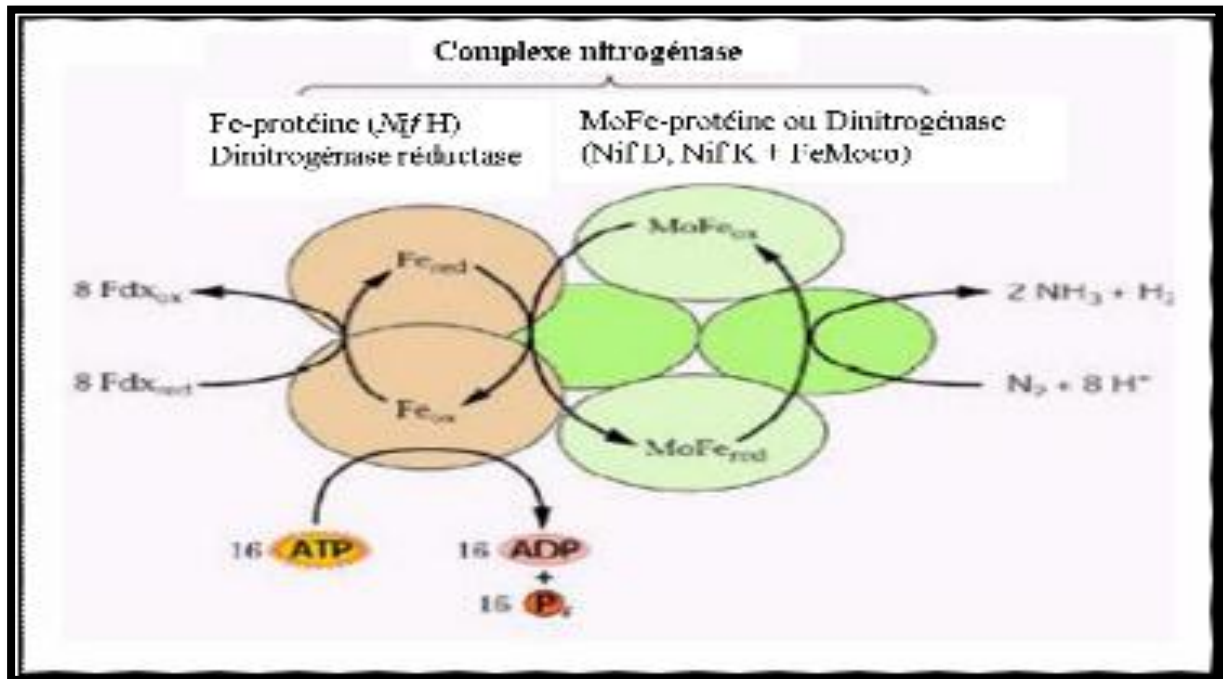


Figure 11. Nitrogénase et mécanismes d'action (Yann, 2006).

Sous catalyse de ce complexe enzymatique, la réduction de l'azote moléculaire se déroule en deux étapes. Lors de la première, la Fe-protéine est réduite par un donneur primaire d'électrons, habituellement la ferrédoxine. Dans la seconde étape, la Fe-protéine réduite transfère les électrons à la Mo-Fe-protéine qui catalyse à la fois la réduction du diazote gazeux et la production d'hydrogène (Hopkins, 2003). L'ATP dans la réaction provient de la respiration aérobie des bactéroïdes. Il réagit avec la Fe-protéine réduite et intervient dans le transfert des électrons entre la Fe-protéine et la Mo-Fe-protéine. Pour chaque molécule de diazote réduite, au moins 16 ATP sont nécessaires, deux par électron. Au total, les légumineuses utilisent jusqu'à 22% de l'énergie issue de leur photosynthèse pour réaliser la fixation azotée dont l'équation générale est la suivante:



À la fin de la réaction, l'ammoniac fixé est converti en glutamine, asparagine, uréides etc. avant d'être transporté dans la sève du xylème pour son assimilation par la plante hôte. Cette conversion est possible grâce aux gènes *nif* et *fix* etc. qui codent en partie pour la

[Tapez ici]

[Tapez ici]

synthèse de différents enzymes catalyseurs comme le glutamate déshydrogénase, la glutamine synthétase (GS) etc.

V.4.5. Gènes *fix*

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques et impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée (**Brewin *et al.*, 1992; Hopkins, 2003**). Certains de ces gènes (*fix L*, *fix J*) sont des régulateurs de la synthèse du gène *nif A*, intervenant dans la régulation de la synthèse de la nitrogénase. D'autres encore (*fix NOPQ*) codent pour la synthèse d'enzymes catalysant la régulation de l'oxygène lors de la fixation comme la *cbb3* cytochrome oxydase. Quoique n'étant pas habituellement désignés par le terme de gènes *fix*, les gènes *dct* (*Dicarboxylate transport genes*) épousent la définition des gènes *fix*. Ils sont nécessaires à l'assimilation par les bactéries des acides dicarboxyliques (succinate, malate) issus des composés carbonés (glucose, fructose) apportés par la plante au cours de la fixation azotée. La mutation de ces gènes chez les bactéries entraîne une faible prolifération des bactéroïdes et une déficience de ceux-ci lors de la fixation de l'azote (**Noel, 2009**).

V.4.6. Autres gènes nécessaires à la nodulation

Les rhizobia possèdent d'autres gènes essentiels au processus de nodulation. Il s'agit des gènes *exo*, *lps* et *ndv* qui codent pour l'expression et la synthèse des molécules de structure de la surface bactérienne (**Broughton *et al.*, 2000; Spaink, 2000**). Ces molécules qui sont successivement les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les α -glucans sont nécessaires pour le développement continu du fil d'infection. Elles sont par ailleurs considérées comme d'importants facteurs dans l'efficacité symbiotique (**Breedveld et Miller, 1998**). En effet, les α -glucans sont majoritairement des molécules du périplasme qui permettent la croissance des bactéries sous des conditions hypoosmotiques (**Pfeffer *et al.*, 1994**). Ils jouent également un rôle important dans la suppression du déclenchement du mécanisme de défense par les phytoalexines chez l'hôte (**Bhagwat *et al.*, 1996**).

Quant aux exopolysaccharides, ils fonctionnent comme des messagers pendant l'infection (**Gonzalez *et al.*, 1996**).

Enfin, les mutants de rhizobia défectifs en la synthèse ou à faible production de lipopolysaccharides n'ont pas la capacité d'induire la formation de cordons d'infection. Ils

[Tapez ici]

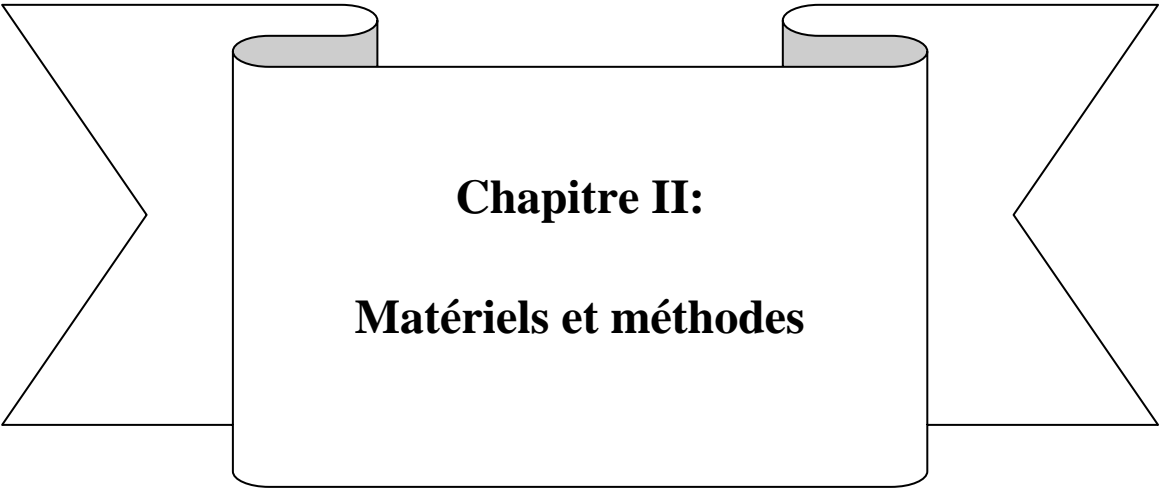
[Tapez ici]

perdent également leur capacité compétitive ou forment des nodosités incomplètement développées (**Lagares *et al.*, 1992**).

Faisant suite à l'activité des gènes d'infection et de nodulation, deux groupes de gènes interviennent dans les étapes tardives de la symbiose. Il s'agit des gènes *nif* et *fix*.

[Tapez ici]

[Tapez ici]



[Tapez ici]

[Tapez ici]

I. Isolement des bactéries à partir des nodules

I.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante *Cicer arietinum L.* (fig 12).



Figure 12. pois chiche.

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par (Vincent, 1970) et (Somasegaran et Hoben, 1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toute fois endommager les nodules.

Au laboratoire, les racines sont rincées à l'eau courante; les nodules sont en suite détachés à 1-2 cm de leur point d'attache. (fig 13).

[Tapez ici]

[Tapez ici]



Figure 13. Rinçage des racines.

I.2. Conservation des nodules

Les nodules obtenus sont rincés à l'eau distillée stérile puis séchés avec du papier filtre stérile et conservés au réfrigérateur à 4°C pour un usage immédiat (jusqu'à 48 h).

Pour une conservation de longue durée il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial: le chlorure de calcium (CaCl_2) anhydre qui permet une longue conservation (6 à 12 mois) (**Vincent, 1970**).

La dessiccation est réalisée dans des péluliers; chacun est rempli au $\frac{3}{4}$ de son volume, par du CaCl_2 anhydre recouvert d'une couche de coton et est identifié par une étiquette de façon à mettre en évidence:

- Le nom de la légumineuse (genre et espèce).
- Le lieu de prélèvement.
- La date de prélèvement (**Maougal, 2004**). (fig 14).

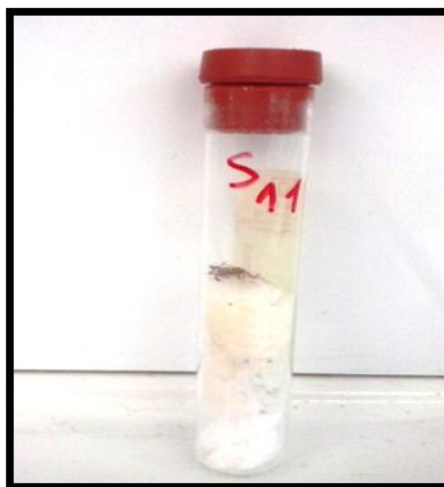


Figure 14. conservation des nodules.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

I.3. Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau au réfrigérateur toute une nuit. Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol absolu puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl₂) acidifié à 0.1% (p/v) pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (**Vincent, 1970**).

I.4. Isolement des souches à partir des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de (**Vincent, 1970**). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA) additionné de rouge Congo (Annexes 1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser.

Les souches bactériennes utilisées dans la partie pratique, sont obtenues après isolement à partir du sol des champs de pois chiche.

En vue de sélectionner des souches intéressantes destinées à l'inoculation des plantes légumineuses et plus particulièrement le pois chiche, nous avons optés pour 6 souches isolées à partir des nodules de pois chiche: une souche de *Mesorhizobium Cicer* (Sam 120) et 5 souches de *Rahnella aquatilis* d'origines divers.

Tableau 05. les souches étudiées.

Souches	Affiliation par le 16S	Similarité (%)	Origine
Sam 22	<i>Rahnella aquatilis</i>	96%	Constantine
Sam 66	<i>Rahnella aquatilis</i>	95%	Biskra
Sam 69	<i>Rahnella aquatilis</i>	97%	N'guaous
Sam 99	<i>Rahnella aquatilis</i>	93%	Batna
Sam 102	<i>M.cicer</i>	98%	Constantine
Sam 112	<i>Rahnella aquatilis</i>	93%	Jiel

I.5. Etude phénotypique des souches

A l'aide d'une anse de platine, on a ensemencé les souches bactériennes dans le milieu YMA+RC (Annexe1) pour pouvoir observer aspect des colonies. (**fig 15**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]



Figure 15. Boîtes de pétrie contenant le YMA+RC (à gauche). Ensemencement (à droite).

I.6. Etude de la solubilisation des phosphate

Un volume de 10µl de culture bactérienne est déposé en spot à la surface des boîtes contiennent du milieu Pikovskaya (Annexe 1) Après incubation à 30°C pendant 7 jours, un halo de transparence apparaît au tour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates. (**fig 16**).

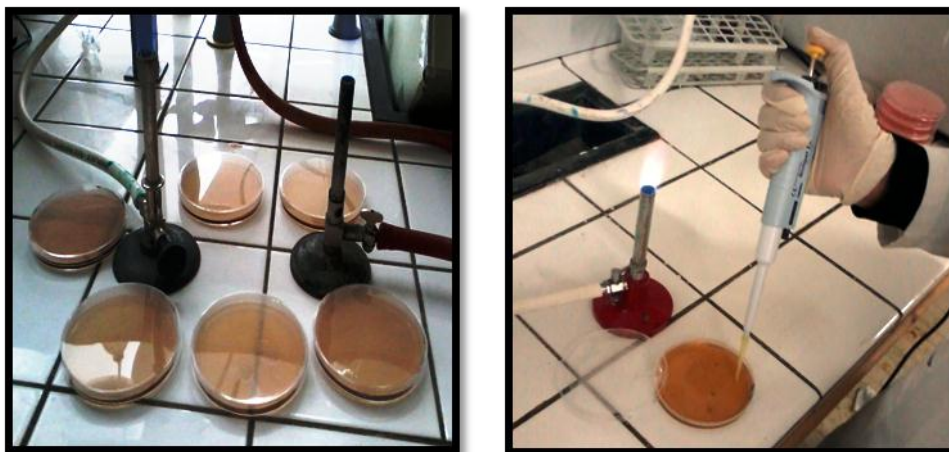


Figure 16. Boîtes de pétrie contenant le Pikovskaya (à gauche). Les spots (à droite).

I.7. Test d'antagonisme (annexe 1)

Le test d'antagonisme fongique été réalisé sur le milieu de culture solide King B (Annexe1), on met des gouttes de la suspension bactérienne dans des boîtes contenant du

[Tapez ici]

[Tapez ici]

milieu et un morceau fongique réparti d'un façon uniforme après 7 jours d'incubation, les bactéries ont un effet d'antagonisme vont limiter la croissance du champignon. (fig 17).



Figure 17. Boites de pétri contiennent le milieu de King B.

II. Test de nodulation (prestations symbiotiques avec la plante-hôte)

Tous les isolats doivent être testés et confirmés avant de les inoculer, le test de nodulation est la capacité et l'aptitude des isolats 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 de la plante hôte (*Cicer arietinum L.*) avec les différents isolats obtenus. Il est conduit dans des jarres de Léonard (Vincent, 1970).

II.1. Préparation et stérilisation du sable

Le sable de rivière est lavé jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée. Est stérilisé par autoclavage à 120 C⁰ pendant 20 mn.

II.2. Préparation des jarres de Léonard (Vincent, 1970)

Des bouteilles en plastique sont coupées latéralement en deux parties. Ces jarres sont stérilisées sous la hotte à flux laminaire par l'eau de javel puis, sont laissée séchées sous la hotte. La partie supérieure de chaque jarre est remplie de sable stérile et humidifié avec la solution nutritive de Fährus (Annexes 2). La partie inférieure du dispositif est remplie de solution nutritive. Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse ce qui permet d'alimenter en continu la partie supérieure en solution nutritive (Saoudi, 2008). (fig 18).

[Tapez ici]

[Tapez ici]



Figure 18. préparation des jarres.

II.3. Stérilisation des graines

Des graines (ou semis) de la plante (*Cicer arietinum L.*) sont stérilisées à l'éthanol 95% pendant 10 secondes puis par l'eau de javel pendant 10 mn. Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile. On les laisse gonfler dans le dernier rinçage pendant 2 heures.

La pré-germination a été réalisée dans des boîtes de Pétri en verre stériles contenant du papier filtre humidifié avec de l'eau distillée stérile, et incubé à 22°C pendant 3 jours à l'obscurité jusqu'à apparition de radicules (**Içgen et al., 2002**) (**Fg 19**).



Figure 19. A flacon contient des graines imbibées dans l'éthanol

B. boîte de Petri contient des graines stériles

II.4. Inoculation des jarres

Après germination, les graines sont plantées dans le sable (partie supérieure de la jarre) à raison de 2 graines par jarre, puis inoculées immédiatement avec 2 ml d'une

[Tapez ici]

[Tapez ici]

suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ($Do \lambda_{600} \approx 1$). Deux jarres ne sont pas inoculées et serviront de témoin.

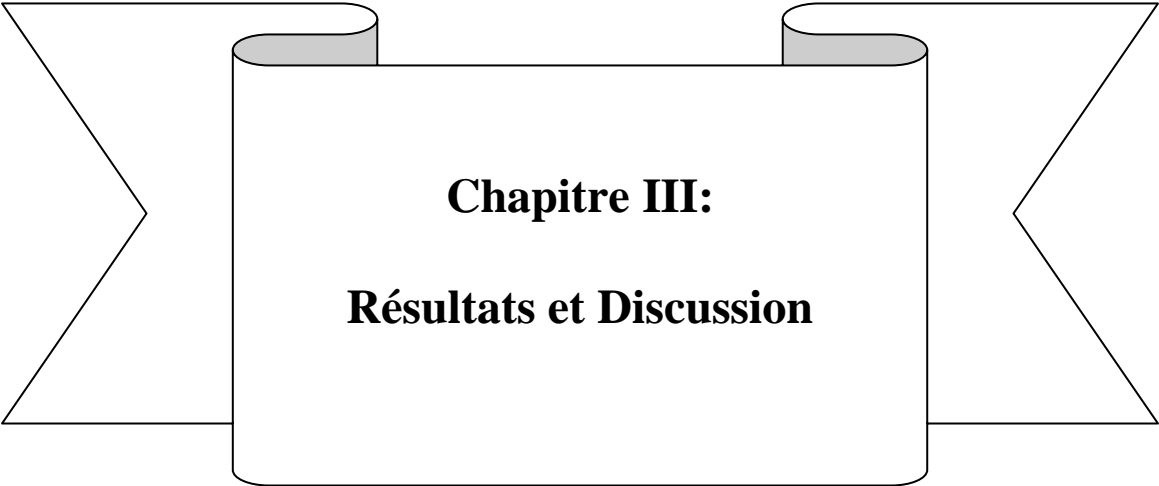
Enfin les jarres sont placées dans une chambre de culture à température ambiante et une luminosité contrôlée pendant huit semaines (Saoudi, 2008) (fig 20).



Figure 20. graines germées (à gauche). Inoculation des jarres (à droite).

[Tapez ici]

[Tapez ici]



[Tapez ici]

[Tapez ici]

I. Caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats

I.1. Croissance des isolats sur YMA, YMA+RG

Les isolats présentent, après 24 heures d'incubation sur milieu YMA, des colonies légèrement élevées lisses, opaques, avec une texture translucide blanchâtres. Elles sont mucilagineuses.

Les souches isolées à partir des nodules absorbent très peu le rouge Congo sur milieu YMA+RC. Ceci est observé chez la majorité des rhizobia (**Jordan, 1984; Vincent, 1970**). (**fig 21**).

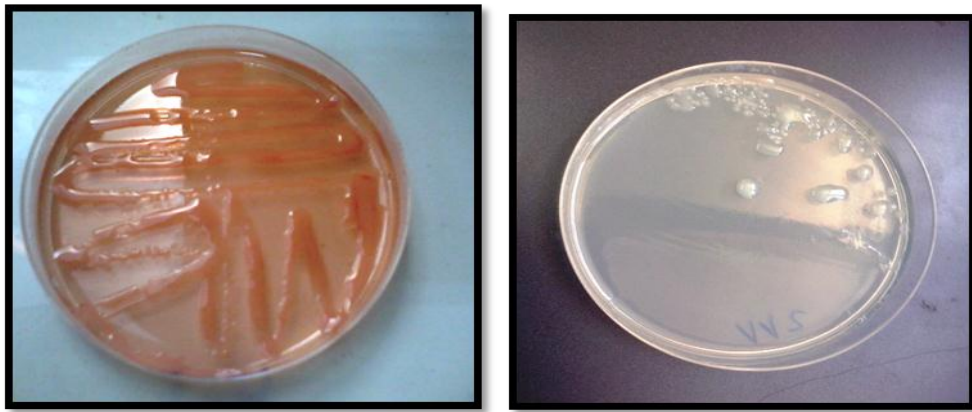


Figure 21. Aspect des colonies sur YMA+RC (à gauche), YMA (à droite).

I.2. Etude de la solubilisation des phosphate

Après incubation des boîtes contenant le milieu Pikovskaya, les bactéries apparaissent dans une zone claire ce qui signifie la capacité de nos souches à solubiliser le phosphate (**fig 38**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]



Figure 22. Boîtes de pétrie contenant le Pikovskaya.

I.3. teste d'antagonisme

La *Fusarium* a été confronté à ces différentes souches, les observations ont portées sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne.

Les résultats obtenus, dans nos essais d'antagonisme in vitro, suggèrent que les souches présentent une activité antifongique (**fig 23**).

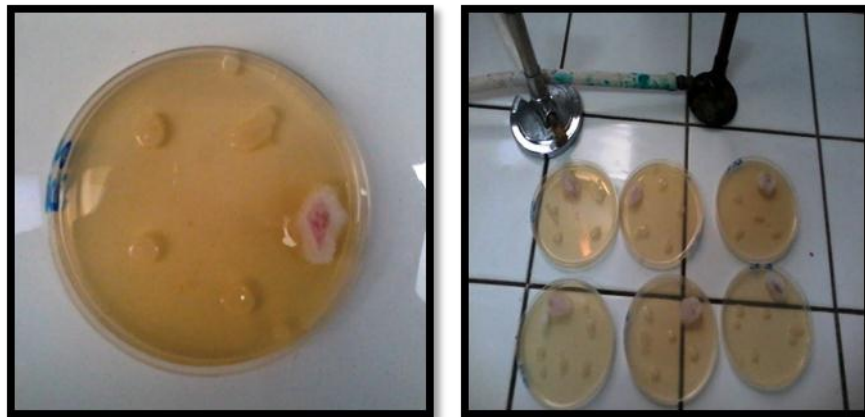


Figure 23. Résultat négatif de la croissance mycélienne.

I.4. Test de nodulation

Vu l'absence des condition bactériologiques (absence de la chambre de culture), on a raté ce test. Toutes les jarres ainsi inoculées sont endommagées (**fig 24**).

[Tapez ici]

[Tapez ici]



Figure 26. Résultat négatif du Test de nodulation.

[Tapez ici]

Conclusion général

[Tapez ici]

Conclusion générale

Dans notre travail on étudie la solubilisation de phosphate et l'effet d'antagonisme des souches bactériennes isolées de la légumineuse *Cicer arietinum*.

En effet toutes les souches se cultivent en 24h sur YMA présentent des colonies légèrement élevées lisses, opaques, avec une texture translucide blanchâtres (elles sont mucilagineuses), les souches isolées à partir des nodules absorbent très peu le rouge Congo sur milieu YMA+RC. Ceci est observé chez la majorité des rhizobia.

Après incubation des boîtes contenant le milieu Pikovskaya, les bactéries apparaissent dans une zone claire ce qui signifie la capacité de nos souches à solubiliser le phosphate.

Les résultats obtenus, dans nos essais d'antagonisme in vitro, suggèrent que les souches présentent une activité antifongique.

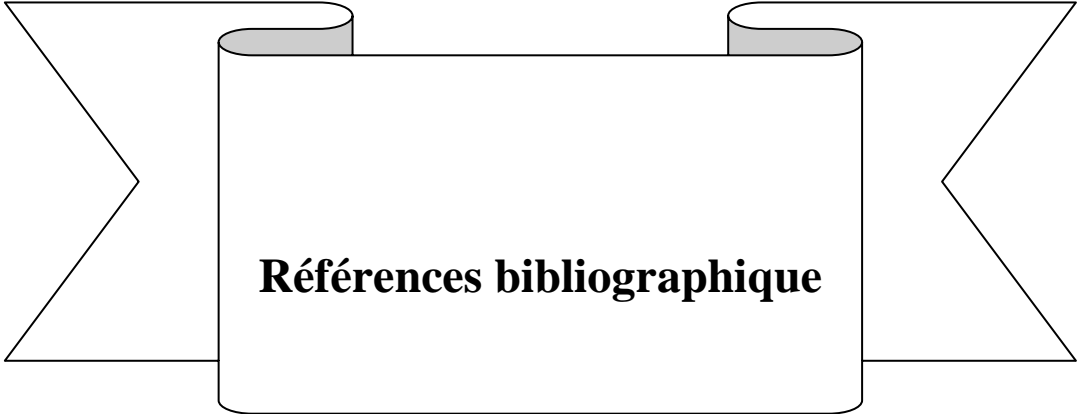
[Tapez ici]

[Tapez ici]

Malheureusement on a raté le test de nodulation parce que les conditions bactériologiques n'était plus favorables (absence de la chambre de culture), donc toutes les jarres inoculées sont endommagées.

[Tapez ici]

[Tapez ici]



[Tapez ici]

[Tapez ici]

Références bibliographiques

Abnatura R.D., Mars 2012. Bulltin technique.

Anonyme e., 2004. Biological Nitrogen Fixation. Page web, consultée en janvier www. national forage and grasslands curriculum.

Beck D.P; Materon L.A; Afandi F., 1993.pratical Rhizobium-legume technology manual.The technical manual N°19.

Berge O; Lodhi A; Brandel et Randelet G; Santaella C; Roncato M.A; Christen R; Heulin T; Achouk W., 2009. *Rhizobium alarii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P59: 367-372.

Bhagwat A.A; Gross K.C; Tully R.E; Keister D., 1996. Glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing α - (16) linkages. *J. Bacteriol.* P 178: 4635-4642.

Bonmatin J.M; Moineau I; Charvet R; Fleche C; Colin M.E; Bengsch E.R., 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem.* P 75: 2027-33.

Breedveld M.W; Miller K.J., 1998. Cell-surface α -glucans. In *The Rhizobiaceae*. Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas J. J., eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. P: 81-96.

Brewin N.J; Downie J.A; Young J.P.W., 1992. Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology, M.R Josha Lederberg. *Rockefeller University New York*. P 3: 239-248.

Broughton W.J; Jabbouri S; Perret X., 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* P 182: 5641-5652.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Burnie G; Forrester S; Greing D; Guest S; Harmany M; Hobly S; Ledgett P; Macoboy S; Molyneux B; Newman D; North T; Purdy G; Ryan S; Schien G; Silk J., 2005.

Botanica.encyclopédie de botanique & d'horticulture.Edition Place des Victoir.

Chen W.M; Zhu W.F; Bontemps C., 2010. Mesorhizobium alhagi sp. Nov., isolated from wild alhagi sparsifolia in north-western China. *Int J Syst Evol Microbiol.* P 60: 958-62.

Cronk Q; Ojeda I; Pennington R.T., 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol.* P 9: 99-103.

Davet P., 1996. *Vie microbienne du sol et production végétale.* Institut National de la Recherche Agronomique. INRA, Paris. P 384.

Debelle F; Moulin L; Mangin B; Denarie J; Boivin C., 2001. Nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimia Polonia Minireview.* P: 48 (2), 359-365.

Debelle F; Rosenberg C; Vasse J; Maillet F; Martinez E; Denarie J; Truchet G., 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* P 168: 1075- 1086.

Debelle F; Sharma S.B., 1986. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucl. Acids Res. H.* P 14: 7453-7472.

Dobbelaere S.J; Vanderleyden; Okon Y., 2003. Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* P22: 107-149.

Esitken A; Karlidag; Ercisli S; Sahin F., 2002. Effects of foliar application of *Bacillus substilis* Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. *Gartenbauwissenschaft.*P 67(4) 139-142.

Fahreus A., 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* P 16: 354-381.

Garcia-Fraile P; Rivas R; Willems A; Peix A; Martens M; Martiner –Molina E; Mateos P.F; Velazquez E., 2007. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P57: 844-848.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Gonzalez J.E; Reuhs B.L; Walker G.C., 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. P 93: 8636-8641.

Goswami R.S; Kistler H.C., 2004. Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. P 5: 55-525.

Guignard J.L; Dupont F., 2005. Botanique. 13^{ème} Edition Masson.

Gu C.T; Wang E.T; Tian C.F; Han T.X; Chen W.F; Sui X.H; Chen W.X., 2008. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: P 1364-1368.

Haas D; Defago G., 2005. Biological control of soil-born pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* P 3: 307-319.

Han T.X; Han L.J., 2008. *Mesorhizobium gobiense* sp. Nov. And *Mesorhizobium tarimense* sp. Nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol.* P 58: 2610-18.

Hopkins W.G., 2003. *Physiologie végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. P 514: 99-101.

Hou B.C; Wang E.T; Li Jr Y; Jia R.Z; Chen W.F; GaoY; Dong R.J; Chen W.X; 2009. *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Širj.) Vassilcz. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P 59: 3051-3057.

Içgen B; Ozcengiz G; Alaeddinoglu N.G., 2002. Evaluation of symbiotic effectiveness of various *Rhizobium cicer* strains , *Res .Microbiol.* P 153: 369- 372

Jordan D.C., 1984. family III. *Rhizobaiaceae*. In N. R. Krieg and J.G. Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. The Williams & Wilkinns, Co., Baltimore. P: 234-245.

Journet E.P., 2004. Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. [Www. crdp-toulouse.fr](http://www.crdp-toulouse.fr)

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Kloepper J.W; Gutierrez-Estrada A; McInroy J.A., 2007. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J., Microbiol.* P 53(2): 159-167.

Lagares A; Caetano-Anolles G; Niehauss K; Lorenzen Orenzen J; Ljunggren H.D; Favelukes G., 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* P 174: 5941-5952.

Laranjo M.C; Branco R; Soares L; Alho M.D.E; Carvalho S; Oliveira., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology.* Vol 92 Issue 6 P 1043.

Laurent D., 1998. Mycotoxine de *Fusarium moniliforme* impliquées dans la leuco encéphalomalacie & quine, Toulouse: université pierre et Marie-Curie. P 04.

Leslie J.F., 1995. *Gibberellafujikuroi*: available population and variable traits. *Canadian journal of botany* 73 (suppl. 1). P: S282-S291.

Lin D.X; Chen W.F; Wang F.Q; Hu D; Wang E.T; Sui X.H; Chen W.X., 2009. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P 59: 1919-1923.

Liu PH; Gan Y; Warkentin T; McDonald C., 2003. Morphological plasticity of chickpea in a semiarid environment. *Crop Sci.* P43: 426-429.

Lopez-Lopez A; Rogel-Hernandez M.A; Boris I., 2011. *Rhizobium grahamii* sp. Nov., From *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria tenatea* nodules and *Rhizobium mesoamericanum* sp.nov. from *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica* nodules. *Int J Syst Evol Microbiol.* Doi : 10.1099/ ijs.0.033555-

Lugtenberg B.J; Chin-A-Woeng T.F; Bloemberg G.V., 2002. Microb-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Leeuwenhoek.* 81: 373-383.

Lu Y.L; Chen W.F; Han L.L; Wang E.T; Chen W.X., 2009. *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P 59: 3006-3011.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Maougal Rym Tinhinen., 2004. Technique de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*): Inoculation et nodulation. P 53.

Mercado-Blanco J; Toro N., 1996. Plasmids in rhizobia: The role of non symbiotic plasmids. *MPMI*. P 9: 535-545.

Nandasena; Kemanthi G; O'Hara; Graham W; Tiwari; Ravi P; Willems; Anne; Howieson; John G., 2009. *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia Int J Syst Evol Microbiol. P 59: 2140-2147.

Noel K.D., 2009. Bacteria Rhizobia. Encyclopedia of microbiology, SCHAECHTER M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA. P 3: 877-893.

Noel., 2009. Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'angole (caganuscajan I) à Yamoussoukrou (centre de la cote d'Ivoire).

Parry D.W; Jenkinson P; McLeod L., 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. Plant Pathology. P 44: 207-238.

Patricia P; Pinto; Raposeiras A.M; Macedo L; Seldin E; Paiv; Nad M.H. Sà., 1998. Effects of high temperature on survival, symiotic performance and genomic modifications of bean nodulating Rhizobium strains. *Revista de Microbiologie*. Print ISSN 0001-3714.

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

Peng G; Yuan Q; Li H; Zhang W; Tan Z., 2008. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. P 58: 2158-2163.

Peypoux F; Bonmatin J.M; Wallach J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol*. P 51(5) 553-563.

Piano S; Neyrotti V; Migheli Q; Gullino M.L., 1997. Biocontrol capability of Press, New York.

Pikovskaya R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. P 17: 362-370.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Pirgozliev S.R; Edwrds S.G; Hare M.C; Jenkinson P., 2003. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*. P 109: 731-742.

Ramirez-Bahena M.H; Garcia-Frail P; Peix A; Valverde A; Rivas R; Igual J.M; Mateos P.F; Martínez –Molina E; Velazquez E., 2008, Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889^{AL}, *Rhizobium phaseoli* 1926^{AL} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL}. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P 58: 2484-2490.

Ren D.W; ChenW.F; Sui X.H; Wang E.T; Chen W.X., 2011. *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P 61: 580-586.

Richter Gerhard., 1993. Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Edition. press polytechniques et universitaires Romandes. P 526.

Rubio L.M; Ludden P.W., 2005. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle.

Saadaallah Kaouthar; Jean-Jacques Drevon; Chedly Abdelly., 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *INRA ,EDP Sciences , Agronomie* 21. P: 627-634.

Samapundo S.F; Devlieghere; B. De Meulenaer; A.H; Geer-aerd; J.F; Van Impe; Debevere J.M., 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F.proliferatum* on corn. *International Journal of food microbiology*. P 105: 35-52.

Sanchez F; Padilla J.E; Hector P; Lara M., 1991. Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* P 42: 507-528.

Saoudi M., 2008. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. P: 15-21.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Sharma P.K; Kundu B.S; Dogra R.C., 1993. Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.* P 11: 741-779.

Somasegaran P; Hoben H .J., 1994. Handbook for Rhizobia:Methods in legumes-rhizobium technology. Springer verlag. New York.Inc. P 450.

Somers E; Vanderleyden J; Srinivasan M., 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol.* 30: 205-240.

Souci; Fachmann ; Kraut., 2008. La composition des aliments. Tableaux des valeurs nutritives, 7^eedition, MedPharm Scientific Publishers/ Taylor & Francis, ISBN. P 978-3-8047-5038-8.

Spaink H.P., 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* P 54: 257-288.

Sutton J.C., 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology.* P 195: 195-209.

Terefework Z., 2002. Diversity and phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. In *microbiology*. Academic dissertation eds., University of Helsinki. P: 1239-9469.

Trevaskis B; Colebatch G; Desbrosses G; Wandrey M; Wienkoop S; Saalbach G; Udvardi M., 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. *Comp Funct Genom.* P 3: 151-157.

Vessey J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* P 255: 571-586.

Vidal; Celine; Chantreuil; Clemence; Berge; Odile; Maure; Lucette; Escarre; Jose; Bena; Gilles; Brunel; Brigitte; Cleyet-Marel; Jean-Claude., 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol.* P 59: 850-855.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Vincent J.M., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook NO15 .Blackwell scientific publishers, Oxford.

Wang; Feng Qin; Wang; En Tao; Liu; Jie; Chen; Qiang; Sui; Xin Hua; Chen; Wen Feng; Chen; Wen Xin., 2007. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol.* P 57: 1192-1199.

Weller D.M; Raajmakers J.M; Gardener B.B; Thomashow L.S; 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phythopathol.* P 40: 309-348.

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

Whipps J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *G.Exp. Bot.* P52: 487-511.

Yann P., 2006. Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium* légumineuses. Master Recherche. Microorganisme du génome aux interactions avec l'hôte. Université de Paul Sabatier. Toulouse III.

Young J.P.W; Haukka K.E., 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* P 133: 87-94.

Young N.D., Mudge J., Ellis T.H., 2003. Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol.* P 6:199-204.

Zaghouane O., 1997. La situation actuelle et les perspectives du développement de légumineuses alimentaire en Algérie, le développement et le rendement en grain du pois chiche (*Cicer arietinum L*). *Céréaliculture* n° 28.Ed, IGTC., P: 13-17.

Zhang X; Sun L; Ma X; Sui X.H; Jiang R., 2011. *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* P61: 2425-2429.

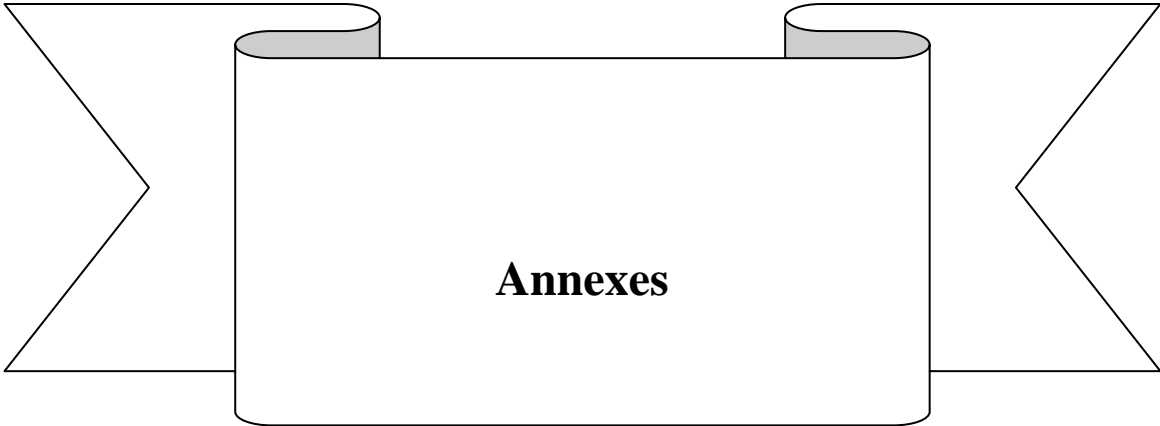
[Tapez ici]

[Tapez ici]

Zhou; Ping Fa; Chen; Wei Min; Wei; Ge Hong; 2010. *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. Int J Syst Evol Microbiol. P 60: 2552-2556.

[Tapez ici]

[Tapez ici]



[Tapez ici]

[Tapez ici]

A N N E X E S

Annexes – 1 Milieux de culture

Yeast Extract Mannitol (YMA)) (Vincent, 1970) en (g/l)

Mannitol	5
Extrait de levure	1
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0, 46
KH ₂ PO ₄	0, 12
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0, 2
NaCl	0, 1
Eau distillée	1000 ml

pH : 6,9

Autoclavage 120° pendant 20 minutes

Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo: Avant de stériliser le milieu on rajoute 15g/l d'agar+Rouge Congo à 0,0025%

Yeast Mannitol Agar-Rouge Congo (YMA+RC) (Vincent, 1970) en (g/l)

Pour 1 L :

YMB	1000 ml
Solution stock de R.C	10 ml
Agar	15

pH : 6,8

Autoclavage à 120°c pendant 20 min après une addition du Rouge Congo (0.25g de R.C dans 100 ml de H₂O D)

Puis ajouter l'agar

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Milieu de Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) en (g/l)

Dglucose	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0, 5
NaCl	0, 2
MgSO ₄ ; 7H ₂ o	0, 1
KCl	0, 2
Extrait de levure	0, 5
MnSO ₄ ; 5H ₂ O	0, 002
FeSO ₂ ; 7H ₂ O	0, 002
K ₂ HPO ₄	5
Eau distillée	1000 ml

pH=7

king B: (camille Dellaras, 2007) en (g/l)

Peptone	20
Glycérol	15 ml
K ₂ HPO ₄	1.5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1.5
Eau distillée	1000 ml
Agar	20

pH: 7.02+/-0.2

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Annexes – 2

Solutions nutritives

Solution de Fahreus (1957)

Macroéléments (g/l)

CaCl ₂	0.001
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.120
KH ₂ PO ₄	0.100
NaPO ₄ .2H ₂ O	0.100
Citrate ferrique	0.005
Eau distillée	1000 ml

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

Stock- microéléments (g/l)

H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ .4H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.14
Eau distillée	1000 ml

pH 6.8-7.0

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Résumé

Des souches qui ont été isolées à partir de la légumineuse *Cicer arietinum* sont identifiées.

Cinq sont des *Rahnella aquatilis* et une *Mesorhizobium Cicer*, dans l'étude de prouver la capacité de ces souches à solubiliser le phosphate ainsi l'activité antifongique, on a procédé à des tests appropriés;

Après incubation des boîtes contenant le milieu Pikovskaya, on observe un résultat positif ce qui signifie la capacité des bactéries à solubiliser le phosphate.

Le test d'antagonisme fongique été réalisé sur le milieu de culture solide King B, Les résultats obtenus suggèrent que les souches présentent une activité antifongique contre le *Fusarium*.

On arrive plus à détecter la production des nodules en raison de l'absence des conditions favorables (notamment l'insuffisance de la luminosité).

Mots clés: *Mesorhizobium*, *Rahnella aquatilis*, *Cicer arietinum*. L, *Fusarium*.

[Tapez ici]

[Tapez ici]

Abstract

Strains which have been isolated from the legume *Cicer arietinum* and identified.

Five are *Rahnella aquatilis* and *Mesorhizobium cicer* in the study to demonstrate the ability of these strains to solubilize phosphate and antifungal activity was carried out appropriate tests;

After incubation the plates containing Pikovskaya medium, a positive result is observed which means the ability of bacteria to solubilize phosphate.

Fungal antagonism The test was performed on the culture medium solid King B, The results suggest that the strains exhibit antifungal activity against *Fusarium*.

It happens more to detect the production of nodules due to the absence of favorable conditions (including inadequate brightness).

Key words: *Mesorhizobium*, *Rahnella aquatilis*, *Cicer arietinum*. L, *Fusarium*

المخلص

[Tapez ici]

[Tapez ici]

تم عزل سلالات من البقوليات *Cicer arietinum* و التي تم تحديدها
خمسة من *Rahnella aquatilis* و واحدة من *Mesorhizobium Cicer* من أجل اثبات قدرة هذه السلالات على
اذابة الفوسفات و نشاط مضاد الفطريات و قد شرعنا في الاختبارات المناسبة؛
بعد مرور فترة الحضانة في علب بيتري تحتوي على وسط *Pikovskaya* لوحظ نتيجة ايجابية مما يعني قدرة هذه
السلالات على اذابة الفوسفات
تجربة التضاد الفطري تحقق في الوسط الزراعي الجامد *King B* النتائج المتحصل عليها تشير الى ان السلالات تعمل
كمضاد الفطريات ضد نشاط *Fusarium*.
نواصل أكثر من اجل الكشف عن انتاج العقيدات في غياب الظروف المناسبة (خصوصاً نقص الانارة)

الكلمات المفتاحية

Mesorhizobium, Rahnella aquatilis, Cicer arietinum. L, Fusarium

[Tapez ici]