

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos profonds remerciements à Madame SAOUDI MOUNA pour nous avoir encadrées dans la réalisation de ce mémoire.

Nous exprimons aussi, tous nos remerciements et notre sincère reconnaissance à Madame D.SATTA d'être acceptée de présider ce travail.

Nous tenons à remercier également Madame R.Gharzouli d'être examinatrice de notre travail.

Nous remercions aussi toute l'équipe du laboratoire de microbiologie spécialement Mme Makroud Hayat pour avoir contribué à la réalisation des expérimentations et leur disponibilité scientifiques sans limite.

Dédicace

Mercie AllAh de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force des croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « Ya kayoum »

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère
« Rabia ».*

A mon père « Abdelhafide », école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

Que dieu les gardes et les protège.

A mes adorables sœurs : Amina, Maroi, et Malak

A mes frères : Rabeh, Amine, et Ayoub

A mon fiancé Yacine

A mes amies et surtout : Hassina, Soumia, Fatima zohra, Sihem et Wahiba

A tous ceux qui me sont chère.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Djalila

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère

Nacera

A mon père Mohamed, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

Que dieu les gardes et les protège.

A mes adorables frères Takki Eddine et Aimen Zakaria.

Et mes Belle Sœurs Roufeida Souâd et la petite Maramé Sirine

Et à mon fiancé Nacer

A la famille « Bouhouhou » et « Beggache ».

A toute mes amies et mes collègues

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Khaoula

Liste des Figures :

Figure 01 : Cycle d'azote	2
Figure 02 : Cycle de la nitrogénase	6
Figure 03 : Représentation du complexe nitrogénase	7
Figure 04 : Assimilation de l'ammonium	8
Figure 05 : Dialogue moléculaire entre les 2 partenaires symbiotiques implique les facteurs <i>Nod</i>	10
Figure 06 : Régulation du facteurs <i>Nod</i>	23
Figure 07 : Structure des facteur <i>Nod</i>	24
Figure 08 : Les étapes de formation d'un nodule indéterminé	28
Figure 09 : Collecte des Nodules	30

Liste des Photos :

Photo 01 :le légumineuse Cicer arietinum récolté du site de Messaoud Boudjriou

(Ain lkarma) Constantine29

Photo 02 : Rinçage des racines et nodules30

Photo 03 : Conservation des nodules.....30

Photo 04 : Jarre de Léonard.....32

Photo 05 : Stérilisation des graines33

Photo 06 : Aspect des colonies.....36

Photo 07 : Jarres contiennent des plantes mortes.....37

Photo 08 : Activité Uréasique38

Photo 09 : Test de cellulase.....38

Photo 10 : Test de réduction de nitrate39

Photo 11 : Test positif de lipase39

Liste des Tableau :

Tableau 01 : Classification récente des Rhizobia (Avril 2012)18

Tableau 02 : Isolats et souches de référence utilisés29

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre Un- Etude bibliographique	
I- cycle d'azote.....	2
I-1 Les pertes de l'azote.....	3
I-1-1 Bactéries dénitrifiantes.....	3
I-1-2 Lessivage d'azote minéral.....	3
I-1-3 Matière végétale ou animale exportée.....	3
I-2 La fixation de l'azote.....	4
I-2-1 La fixation industrielle de l'azote	4
I-2-2 La fixation biologique de l'azote.....	4
I-3- Les bactéries fixatrices d'azote.....	4
a)-Les fixateurs libres	4
b)- Les fixateurs symbiotiques	5
c)- Autres formes de fixation de l'azote : les orages.....	5
d) Bactéries et Cyanobactéries fixatrices d'azote du sol.....	5
I-4 Biochimie de la Fixation.....	5
I-4-1 -La nitrogénase.....	5
I-4-2 La leghémoglobine.....	7
I-4-3Assimilation de l'ammonium.....	8
II- Interaction moléculaire plante-Rhizobium	8
III- Spécificité de la symbiose.....	10
IV- Le macrosymbiont : la légumineuse (ou fabacées).....	11
IV-1 - Présentation générale des légumineuses.....	11
IV-2 Principales caractéristiques des légumineuses.....	12
IV-3 Classification des légumineuses.....	12
IV-4 Le Pois chiche	13
IV-4-1 Généralités	13
IV-4-2 Historique	13
IV-4-3 Taxonomie et caractéristique botanique	13
IV- 5 Intérêts du pois chiche	14

IV-5-1 Intérêts alimentaire	14
IV-5-2 Intérêt agronomique et écologique.....	15
IV-6 Zones de culture du pois chiche.....	15
V- Le microsymbiant : <i>Le Rhizobium</i>	16
V-1 Caractères généraux	16
V-2 Caractères biochimiques et physiologiques.....	16
V-3 Caractères génétiques	17
V-4 Classification actuelle des Rhizobiums	18
V-5 Les Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes	20
V-6 Mode d'action des PGPRs	21
VI-Génétique de la nodulation	22
VI-1 Les gènes de la nodulation <i>nod</i>	22
VI-2 Les gènes de la fixation de l'azote <i>nif</i> et <i>fix</i>	25
VI-3 Autres gènes.....	25
VI-4 Les étapes de la nodulation.....	25
VI-4-1 Préinfection	25
VI-4-2 Infection	26
VI-4- 3 Développement du nodule	26
VI-4-4 Structure du nodule	27

Chapitre Deux : Matériels et Méthodes

I-Isolement des bactéries à partir des nodules.....	29
I-1- Collecte des nodule.....	29
I-2- Conservation des nodules.....	30
I-3- Isolement des bactéries à partir des nodules	31
I-4- Observations des colonies et conservation des isolats.....	31
II-Test de nodulation	31
II-1 Préparation des jarres de Léonard (Vincent, 1970).....	32
II-2 Préparation du sable.....	32
II-3 Stérilisation des graines.....	32

II-4 - Inoculation des jarres.....	33
III-Caractérisation enzymatique des isolats.....	33
III-1-Recherche des enzymes spécifiques.....	33
III-1-1-Hydrolyse de l'urée	33
III-1-2- Activité cellulosique.....	34
III-1-3- Réduction des nitrates.....	34
III-1-4- Recherche de lipase.....	34
Chapitre trois : Résultats et Discussions	
I-Aspect Morphologique.....	36
I-1 Observations des colonies et conservation des isolats.....	36
II-Teste de nodulation.....	36
III-Recherche d'enzymes spécifiques.....	37
III-1 Hydrolyse de l'urée.....	37
III-2 Activité cellulosique.....	38
III-3 Réduction de nitrate.....	38
III-4 Teste de lipase.....	39

Conclusion

Annexes

Références Bibliographiques

Résumé

Introduction

Les légumineuses sont des plantes herbacées, des arbustes, des lianes ou des arbres à racines présentant souvent des nodosités traduisant une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote.

L'établissement de la symbiose plante-microorganisme est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, entre la bactérie et la plante hôte. La plante produit des composés (flavonoïdes) qui attirent les bactéries fixatrices d'azote autour des racines. Par un phénomène de reconnaissance,

L'association symbiotique rhizobia- pois chiche montre une spécificité de haut degré où seulement deux espèces de rhizobia (*Mesorhizobium cicer* et *Mesorhizobium Mediterraneum*) peuvent former des gros nodules effectrices (fixateurs d'azote sur les racines de pois chiche (Nour et al., 1994b ; Nour et al., 1995 ; Zakhia et de lajedie, 2001). En outre, certaines espèces du genre *Sinorhizobium* (*S. medicae* et *S. meliloti*) sont capables d'infecter *Cicer arietinum*. mais en formant des petites nodules inefficaces (Aouani et al., 2001)

Vu son intérêt nutritionnel et agronomique, une meilleure connaissance des rhizobia nodulant le pois chiche dans le sol algérien, l'amélioration du rendement de cette légumineuse.

Dans l'objectif de notre travail, nous sommes intéressés à l'étude des souches *Ranella* vis-à-vis à la production de certaines enzymes impliquant dans le processus de la nodulation.

Pour cela, nous avons procédé un plan de travail à suivre :

- Revue bibliographique
- Matériels et Méthodes
- Résultats et discussion
- Conclusion



Révue

Bibliographique

I-Le cycle de l'azote

L'atmosphère terrestre est composée à près de 80% de N_2 . L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques (les acides aminés et protéines, en particulier (Zahran, 1999).

Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou, parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Drevon, J.J.2004)

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des microorganismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée ; et le cycle recommence.

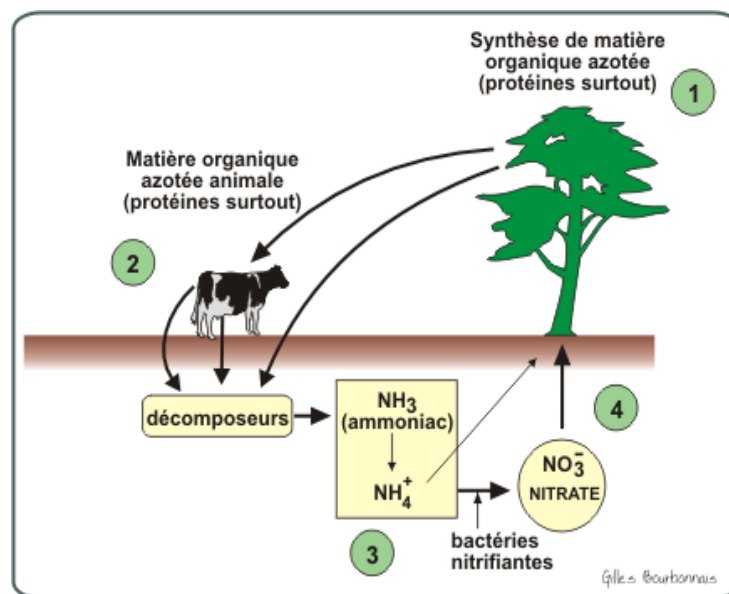


Figure 1 : Cycle de l'azote

1-Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions NO_3^- puisés dans le sol.

2. Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des acides aminés fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal.

3. Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en CO_2 , H_2O et ammoniac (NH_3). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH_4^+

4. D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le NH_4^+ en nitrate (NO_3^-) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion NH_4^+ qui se forme directement à partir d'ammoniac.

I-1 Les pertes de l'azote

L'azote ne peut pas être recyclé à 100%, il y a toujours des pertes qui semblent être réalisées par :

I-1-1 Bactéries dénitrifiantes

Certaines bactéries du sol, dans certaines conditions, peuvent transformer l'azote minéral des sols (NO_3^-) en azote atmosphérique (N_2) inutilisable par les plantes. Ces bactéries sont généralement anaérobies facultatives. Leur activité dénitrifiante est inhibée par l'oxygène. Tant que le sol est bien aéré, elles ont peu de chance de se développer. Mais si le sol est inondé (donc privé d'oxygène) il peut alors rapidement perdre ses engrais azotés.

I-1-2 Lessivage d'azote minéral

Si le sol retient mal l'eau, l'azote minéral peut être entraîné en profondeur vers les nappes d'eau souterraines ou vers les cours d'eau avoisinants.

I-1-3 Matière végétale ou animale exportée

Toute matière vivante enlevée du milieu ne sera pas recyclée en engrais azoté. C'est le cas en agriculture ou lorsqu'on déboise une forêt.

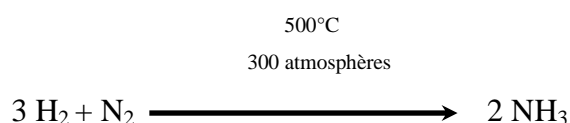
Chaque plante qu'on récolte et qu'on emporte ne retourne pas se décomposer dans le sol. L'azote que de cette plante avait puisé dans le sol pour croître ne retourne pas au sol à la mort de la plante. Un sol agricole, par exemple, où la majeure partie de la végétation est récoltée et exportée, finit par s'appauvrir en azote (et autres éléments puisés par la plante). Il en est de même pour une forêt que l'on déboise (il faut dire que le bois proprement dit qu'on prélève n'est pas tellement riche en N, P ou K mais c'est surtout de la cellulose (C, O et H).

Une bonne partie de l'azote d'un champ de blé, par exemple, va se retrouver dans les cours d'eau où sont déversées les eaux d'égouts des grandes villes et non dans le champ d'où vient ce blé. Le champ d'où vient le blé a perdu de sa fertilité et le cours d'eau, lui, en a maintenant trop (nous verrons, plus loin, l'effet sur le cours d'eau de cette surfertilisation).

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-Bosh**



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 (le gaz naturel pour fournir l'hydrogène et température et pression élevées nécessaires pour la réaction). On produit environ 40 millions de tonnes d'ammoniac par le procédé Haber/Bosh 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.

Les hauts rendements agricoles qui permettent actuellement de nourrir la population mondiale ne seraient pas possibles sans cette production industrielle d'engrais azoté.

I-2-2 La fixation biologique de l'azote

C'est le processus de la fixation biologique de l'azote qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement.

C'est une réduction enzymatique de N₂ (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH₃) ; cette forme de N combiné, appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. Dans le système biologique fixateur de N₂ les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères (pression de 250-1.000 atm de N₂ et température de 450°C)

I-3- Les bactéries fixatrices d'azote

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, mais la plupart des espèces économiquement importantes, 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.

L'ammoniac est rapidement transformé en nitrates par les bactéries du sol.

I-4 Biochimie de la Fixation

I-4-1 -La nitrogénase

Dans l'industrie, la fixation de l'azote est typiquement effectuée en présence de fer agissant comme catalyseur, à environ 500°C à une pression de 300 atm. Il n'est pas surprenant, par conséquent, que le processus biologique de fixation de l'azote nécessite un enzyme complexe : c'est le complexe nitrogénase.

Le complexe nitrogénase, qui réalise cette transformation fondamentale, est constitué de deux protéines (Fig2) :

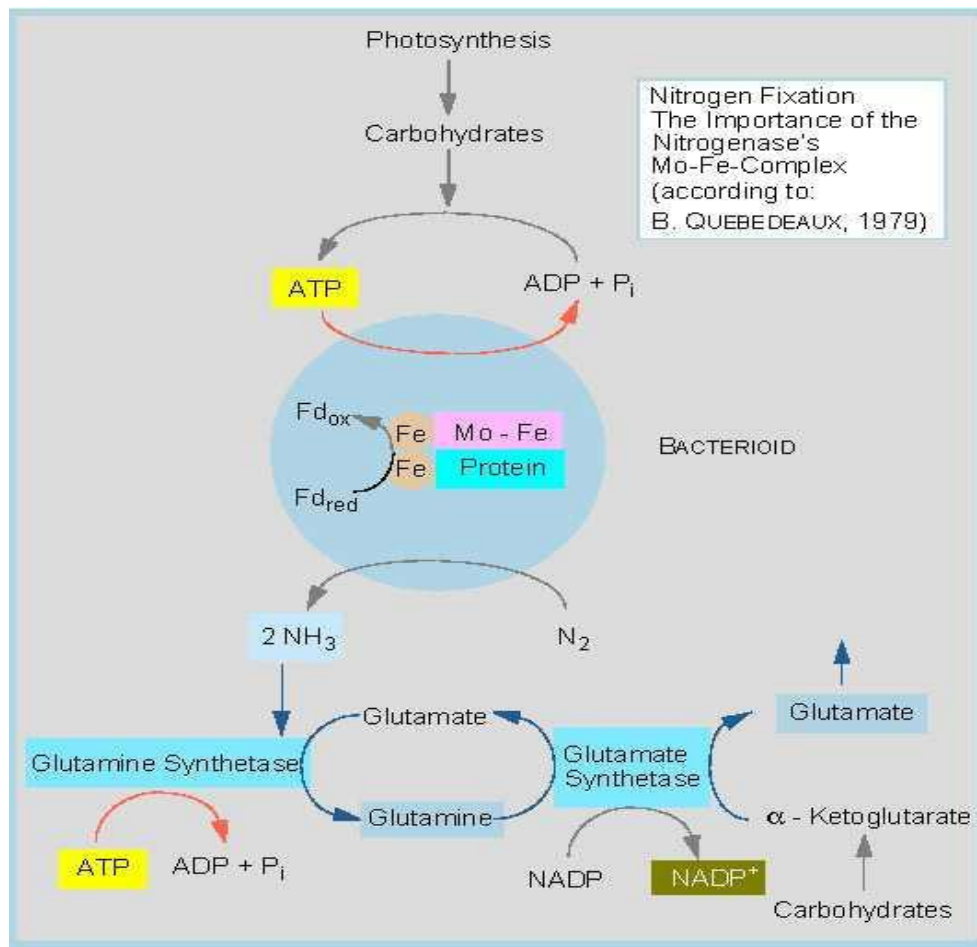


Figure 2 : Cycle de la Nitrogénase

1) Une dinitrogénase réductase : (la nitrogénase I) qui fournit des électrons de haut pouvoir Réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du Fer et se comporte comme Une réductase de 64 KDa (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003)

2) Une nitrogénase : appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante Principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramérique) $\alpha_2 \beta_2$ de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4 Fe - 4 S) reliés entre eux deux par deux, ce Synthèse bibliographique tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire N₂ en NH₃. (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003)

Le transfert des électrons de la réductase à la nitrogénase est couplé à l'hydrolyse de l'ATP Par réduction (Fig 3)

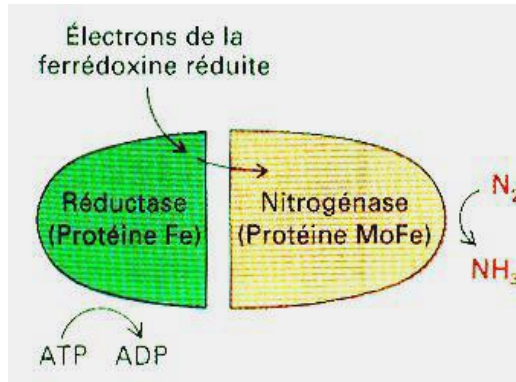
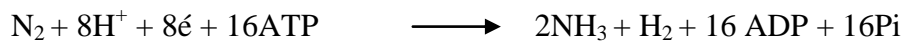


Figure 3 : Représentation du complexe nitrogénase.

Le bilan global de la réaction catalysée par la nitrogénase est :



I-4-2 La leghémoglobine

Le complexe nitrogénase est extrêmement sensible à l'inactivation par O₂. La Leghémoglobine abaisse considérablement la concentration d'O₂ libre dans les nodules de la Plante en le fixant ; l'oxygène fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber.

Le site actif contenant le molybdène du complexe nitrogénase est spécifiquement conçu pour réduire l'azote moléculaire (N₂), mais peut être aisément empoisonné par l'oxygène moléculaire libre (O₂ libre).

Néanmoins, les bactéroïdes ont également besoin, comme la plante hôte, d'un ravitaillement régulier en oxygène pour leur métabolisme. La plante hôte, répond à ces exigences en synthétisant de grandes quantités de leghémoglobine, qui va porter l'oxygène libre à un niveau suffisamment faible pour ne pas endommager la nitrogénase.

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

I-4-3 Assimilation de l'ammonium

Quelque soit l'origine du NH_4^+ celui-ci va être pris en charge, à l'intérieur de la plante, par un système enzymatique, GS-GOGAT. Sous ce nom barbare se cache deux enzymes travaillant à la chaîne. La première (GS pour Glutamine Synthase) rajoute un NH_3 à une molécule de glutamate. La glutamine ainsi formée, transfère un de ses groupements azotés à un acide céto-glutarate, grâce à la seconde enzyme GOGAT (pour Glutamine OxoGlutamate Amino Transférase). On obtient alors deux molécules de glutamate, les réactions peuvent alors s'enchaîner en boucle (Fig 4). (Brewin et col. 1992)

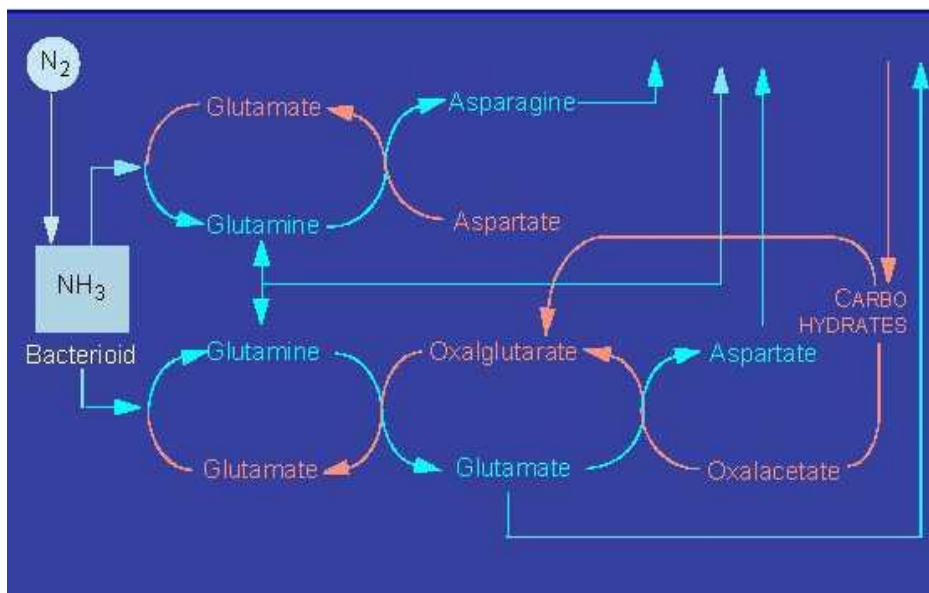


Figure 04 : Assimilation de l'Ammonium

Le glutamate sert également de matrice aux différents acides aminés. Grâce à une transaminase, il transfère un de ses groupements azotés à une autre molécule pour former un acide aminé et un cétoacide. Les plantes symbiotiques fixent ainsi de 300 à 400 kg de diazote par hectare et par an.

II- Interaction moléculaire plante-Rhizobium

Les légumineuses établissent une relation symbiotique avec les bactéries du sol, le *Rhizobium* (figure 05), cette association se manifeste par la formation sur les racines des légumineuses hôtes des nodosités spécialisées, les nodosités. Au sein desquelles, les *Rhizobia* réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, assimilable par les plantes. (Lindstroïm, 2002 ; Dénarié et col., 2004).

L'interaction plante-Rhizobium est hautement spécifique : une espèce bactérienne n'affecte et nodule qu'un nombre défini d'espèce végétale, néanmoins le degré de spécificité est variable selon la souche bactérienne et la plante hôte. **(Debellé, 2001)**.

L'association entre les *Rhizobium* et les légumineuses est facilitée par l'interférence moléculaire qui a lieu dans la rhizosphère. **(Terefework, 2002)**. Divers composés déterminant une chimiotaxie positive sont émis par la racine, tel que : les hydrates de carbone, des acides aminés, des acides organiques, des vitamines et des dérivés phénoliques, dont la plupart augmente la croissance des micro-organismes dans la rhizosphère. **(Pelmont, 1995 ; Terefework, 2002)**. Parmi ces composés, les flavonoïdes sont importants dans la perspective symbiotique, car ils induisent les gènes *nod* contrôlant la synthèse des facteurs *nod*, responsable de la spécificité et de la reconnaissance entre les symbiotes et le déclenchement de l'organogénèse nodulaire. Donc le développement nodulaire est programmé par la plante et déclenché par la bactérie. **(Terefework, 2002)**.

Les gènes *nod D* qui reconnaissent les flavonoïdes inducteurs, activent la transcription des opérons porteurs d'autres gènes notamment l'opéron *nod ABC*, *nod EF* et la *nod M*. **(Pelmont, 1995)**.

Les facteurs *Nod* produits par des *Rhizobia* différents partagent une structure chimique comme d'un lipochitoooligosaccharide (LCO), un type de molécule qui a été détecté jusqu'à présent exclusivement chez les *Rhizobia*. **(Debellé, 2001)**.

Les facteurs *Nod*, qui sont des oligomères de chitine N-acylés par une chaîne d'acide gras ; chaque espèce de *Rhizobium* synthétise un type de facteurs *Nod* présentant une combinaison de substitutions chimiques particulière qui confère à la bactérie sa spécificité d'hôte. **(Dénarié, 2004)**. Les facteurs *Nod* induisent de profondes transformations dans les racines de l'hôte pour préparer l'infection symbiotique et induire l'organogénèse des nodosités : réorganisation du cytosquelette, activation de la transcription de gènes symbiotiques précoces (nodulines), une dépolarisation de la membrane plasmique et un flux des ions, induction des divisions cellulaires. **(Pingret et col., 1998. Dénarié, 2001. Corbière, 2002)**.

Les LCO exercent une action hormonale sur la racine et provoquent l'incurvation de l'extrémité des poils absorbants en crochet caractéristiques ainsi que la formation de pré-nodules par stimulation de la mitose des cellules corticales.

Les facteurs *Nod* spécifique sont fonctionnels à des concentrations de l'ordre de picomolaire sur les légumineuses, ce qui suggère les facteurs *Nod* sont perçu par des récepteurs spécifiques à haute affinité (fig 5). (Pingret et col., 1998).

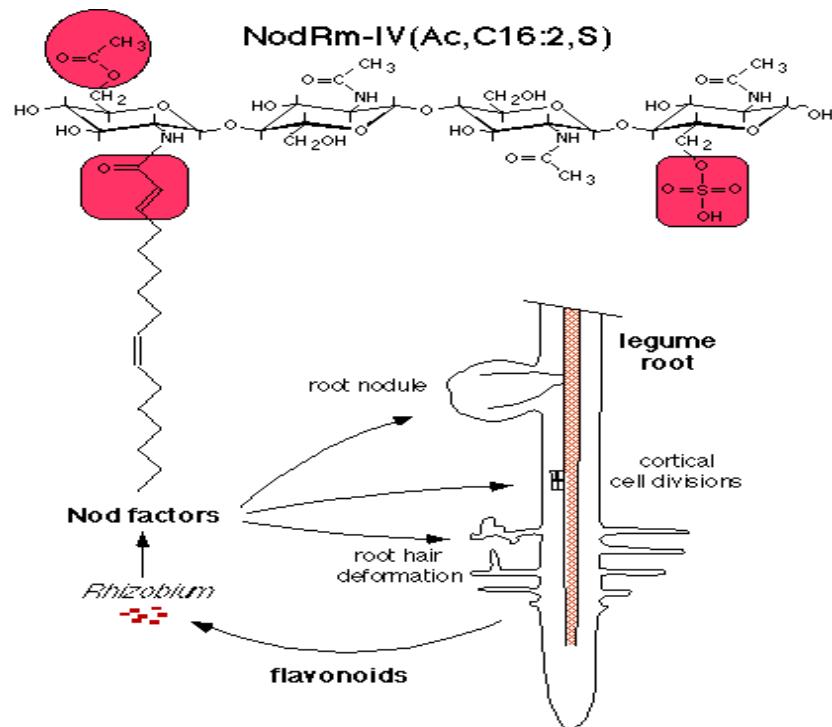


Figure 5: Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs *Nod*. (Deléglise, 2001)

III- Spécificité de la symbiose

La symbiose légumineuse – *Rhizobium* est très spécifique, un *Rhizobium* donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient au son spectre d'hôte. Et le contraire est juste. Les amplitudes des spectres des légumineuses et des rhizobia sont très variables. En effet, on retrouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et col, 1988), alors que cette même légumineuses possède d'autres partenaires bactérien (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*.) (Boivin et col 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec les espèces des genres *Medicago*, *Meliloti* et

Trigonelle (De Lajudie et col 1994). Par contre, d'autres espèces nécessitent des dispositions particulières à la symbiose, comme le pois afghan (*Galga*) (Firmin et col 1993, Terefework et col 1998). En outre, les études de spectre d'hôte ont révélé qu'en proportion peu de rhizobia ne s'associait qu'avec une seule espèce de légumineuse ; la plupart des rhizobia pouvant établir une symbiose avec différents partenaires végétaux (Zahran 2001, Perret et col 2000 ; Tan et col 1999).

IV-Le macrosymbiont : la légumineuse (ou fabacées)

Sont les graines de plantes à gousses et se présentent sous diverses formes et couleurs, parmi les plus connues se trouvent les lentilles, les pois secs, les féveroles et les fèves, les haricots secs, le soja et les arachides.

VI-1 - Présentation générale des légumineuses

La famille des légumineuses est très diverse avec trois sous familles : Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow. 2003) et compte environ 20.000 espèces (Gepts et col. 2005) la sous famille des Papilionoideae regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement. Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés *Galegoïdes* et *Phaseoloïdes*, à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des *Aeschynomeneae* (Broughton et al. 2003). Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève, ...) ou l'alimentation animale (soja, uzerne,...) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène). Les légumineuses à graines constituent toujours une part importante de l'alimentation du monde, particulièrement dans les pays en développement où elle sont la principale source de protéine pour l'homme. Citons le Haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier.

Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles céréales : on distingue les espèces à graines riches en protéines et en huile, sans amidon, classées comme protéagineux (pois, féverole) ou légumes secs (haricote, lentille, pois chiche).

VI-2 Principales caractéristiques des légumineuses

Il existe souvent une spécificité étroite entre les partenaires de l'interaction symbiotique, c'est –à dire qu'une espèce de rhizobium donnée ne peut former des nodosités fixatrices d'azote que sur un nombre limité d'espèces de légumineuses.

VI-3 Classification des légumineuses

La famille des fabacées est une famille des plantes dicotylédones. Pendant longtemps, elles portaient le nom Papilionacées à cause de la forme particulière de leurs fleurs où l'on reconnaît un pétale supérieure ou étendard, deux pétales latéraux ou ailes et deux pétales inférieurs unis ou carène. De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et huiles végétales (Graham et Vance, 2003) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. La plus grande partie des légumineuses (88%) des espèces étudiées interagissent avec les bactéries du genre *Rhizobium* pour former des nodules fixateurs d'azote (De Faria et col. 1989; Hirsh et col, 2001). De ce fait les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Patriarca et col, 2004; Gage, 2004; Stacey et col 2006)

Le nom de la Famille des *Fabaceae*, découle du nom de genre *Faba*. Or, il se trouve que ce nom de genre n'est plus utilisé, ayant laissé place au genre *Vicia*. Un représentant de l'ancien genre *Faba* (du latin *faba*, fève) est la fève, anciennement *Faba vulgaris*, maintenant *Vicia faba*.

La famille est aussi appelée couramment **Légumineuses** (*Leguminosae*) ou **Papilionacées** (*Papilionaceae*), mais ces ne sont pas de vrais synonymes. Chaque nom s'applique à une condition particulière. Selon les classifications, la composition de cette famille varie:

- Les Fabacées, au sens limité, est adopté en classification classique (1981). Ce groupe est nommé *Fabaceae (stricto sensu)* ou *Papilionaceae*. Cette famille comprend 12 000 espèces réparties en plus de 400 genres.

(En classification phylogénétique, ce groupe des plantes serait la sous-famille *Faboideae*.)

- Les Fabacées, au sens large, est adopté en classification phylogénétique d'APG II (2003). Ce groupe est nommé *Fabaceae (lato sensu)* ou *Leguminosae*. Cette famille comprend 18 000

espèces réparties dans trois sous-familles. (En classification classique, ce groupe des plantes serait l'ordre des *Fabales* avec trois familles.).

Dans la classification des légumineuses, il apparaît les trois sous-familles :

sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée ;

sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière;

sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon.

Les Fabacées, au sens large, sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. C'est une famille cosmopolite des zones froides à tropicales. La fonction chlorophyllienne est parfois transférée aux tiges.

VI-4 Le Pois chiche :

VI-4-1 Généralités :

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L) est parmi les légumineuses alimentaires à grosses graines les plus cultivées dans le monde avec le pois, la lentille et la fève (**Gordan, 2001**)

VI-4-2 Historique :

Le pois chiche, *Cicer arietinum* L .compte parmi les légumineuses à graines domestiquées par l'homme depuis l'Antiquité. Le nom spécifique « arietinum » fait référence à la forme de la graine en tête de bélier « *aries* » flanquée de ses cornes.

Le pois chiche est originaire du Proche-Orient (sud-est de la Turquie, Syrie) il y'a environ 94000 année. L'expansion de la culture de cette plante à été rapide dans les régions méditerranéennes, car elle était cultivée en Egypte depuis au moins 6000ans. Ensuite, sa culture diffusa dans les autres régions autour de la méditerranée pour atteindre l'Europe du Nord et enfin l'Inde en passant par l'Afghanistan, d'où le nom hindi « *Kabuli Chana* », en référence au nom de la capitale de l'Afghanistan « Kaboul » (**site web n°01**)

VI-4-3 Taxonomie et caractéristique botanique :

Sur le plan taxonomique, le pois chiche appartient à la

Règne

Plantae

Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous- classe	<i>Rosidze</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>fabaceae</i>
Genre	<i>cicer</i>
Espèce	<i>cicer artietinum L</i> (Spichiger et al.2002)

Sur le plan botanique ,le pois chiche est décrit comme une plante herbacée annuelle , dressée , ramifiée depuis la base , et couverte de poils glandeux sa germination est du type hypogène c.à.d. les cotylédons restent souterrains ces racines peuvent atteindre 1 mètre de profondeur et sa tige anguleuse à une hauteur de 0,20 à 1 mètre de haut , les feuilles sont composé de 7 à 17 folioles ovale à bord dentelé attachées à un seul pétiole les fleurs, sont solitaires ,pédunculées et peuvent être blanche, bleues ou violette, le fruit est une fousse, pelucheuse et pendante, qui contient 1à 2 graines globuleuses (Gaussen et al.,1982)

Selon la taille des graines et des feuilles ainsi que la couleur des fleurs l'espèce *cicer arietinum L* est répartie en deux groupes

Type *kabuli* (nommé Garbanzo) : comporte les variétés à grosses graines (poids supérieur à 25g/100graines) de formes rondes, de couleur crème pâle et reconvertes d'un tégument mince, donnant des plantes de grandes tailles des fleurs blanches et des feuilles larges et longues de 10à20 mm. Type *desi* : renferme les variétés à petites graines (poids inférieur à 25 g /100 graines)de forme irrégulière et de couleurs variées (blanc, vert, violet, rose ou marron), ayant un tégument épais , souvent pigmenté. Ce type donne des plantes de petit es tailles à fleurs typiquement violette et des feuilles petites de 6à9 mm de long (Gordan ,2002b)

VI- 5 Intérêts du pois chiche :

VI-5-1 Intérêts alimentaire :

le pois chiche constitue une excellente source de protéines (20,5%) , de glucides (61,0%), de fibres, de vitamines(groupe B) et des minéraux (phosphore et potassium) avec

une valeur énergétique de 362 calories pour 100g .par contre , le pois chiche est faible en sel en cholestérol et à haute teneur en fibre , sa farine étant exempte de gluten , convient aux personnes souffrant de la maladie caeliaque (Gordan,2006)

Les résidus de récolte de cette plante sont utilisés dans l'alimentation des bovins.

En Algérie, l'utilisation des graines pour l'engraissement des bovins est pratiquée seulement sur certaines par celles où la production à été trop faible (**Maatougui, 1998**)

VI-5-2 Intérêt agronomique et écologique :

Le pois chiche exerce une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique établie avec les rhizobia cette symbiose permet de fixer de 220 à 364 kg d'azote à l'hectare et de minimiser en revanche l'utilisation des engrais chimique. Polluants (**Bacha ,1998**).Ainsi, l'introduction du pois chiche dans les assolements permet d'augmenter le rendement grainier et la concentration protéique de 6 à 16% en comparaison avec l'alterance blé dur – blé tendre (**Larbi, 1991**)

VI-6 Zones de culture du pois chiche :

Dans le monde, la culture du pois chiche est répartie dans les différents continents.

En effet, sa culture se fait en Asie, En Amérique du Nord et Sud, au Moyen-Orient, Ainsi qu'en Afrique du Sud et en Australie.

Dans le bassin méditerranéen, la culture de cette légumineuse est localisée au sud de l'Europe (France, Espagne et Italie), en Afrique du nord (Maroc , Algérie , Tunisie et Egypte) Ainsi qu'en Turquie et Syrie (**Gordan,2006**)

L'Asie et l'Australie cultivent principalement le pois chiche de type *Desi* alors que les autres régions du monde cultivent essentiellement le type *Kabuli*. le Canada fait l'exception en produisant à les deux types *Desi* et *Kabuli* (**Gordan, 2002b**)

En Algérie , la culture du pois chiche est pratiquée en deux périodes de l'année printemps et hiver .En effet , le semis du printemps (mars, Avril) donne des rendements faibles en farines à causes du déficit hydrique et des fortes températures touchant notre pays dans cette période de l'année (**Zeghouane ,1993**) cependant , le semis précoce ou semis d'hiver (Novembre, Décembre)

se caractérise par l'amélioration du potentiel de production de pois chiche mais à condition d'utiliser des variétés résistantes au froid et aux maladies telles que l'antracnose et le flétrissement (bouhaouchine et al., 1998) Parmi les variétés utilisées dans le semis d'hiver, on cite : FLiP84-92 et FLiP90-13 (bouznad et al., 1998).

Le climat méditerranéen tempéré de l'Algérie, permet la culture du pois chiche dans de vaste région du Nord du pays. En effet, la culture est pratiquée à l'Ouest (Tlemcen, Sidi Bel Abbés, Chlef) au centre (Tizi ouazou, Bawira, Médéa et Blida) et à l'Est Algérien (Mila, Skikda, Constantine et Guelma) en outre, la wilaya de Biskra se caractérise par la culture de nombreuses légumineuses dont le pois chiche (Maatougui, 1998).

V- Le microsymbionte : Le *Rhizobium*

Les *Rhizobiales* furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est Franck en 1891 premier à proposer le nom de *Rhizobium*.

Actuellement les familles des *Rhizobiaceae* comportent 4 genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* ; en plus, 3 autres nouveaux genres ont été proposés : *Azobacterium*, *Sinorhizobium*, *Photobacterium*. (Werner, 1992)

V-1 Caractères généraux

Les *Rhizobium* sont des bactéries Gram négatives, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 de largeur et de 1,2 à 3 de longueur et non sporulant (Jordan, 1984). Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'alpha *Proteobacteria* (Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Laranjo et al. 2002)

Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches

Les espèces de *Rhizobium* en culture ont besoin d'un milieu qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (Somasegaran et Hoben, 1994).

V-2 Caractères biochimiques et physiologiques

Les *Rhizobiums* possèdent un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobies ; alors que dans les conditions d'anaérobies, les espèces de

Rhizobium peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (Benguedouer2000 ; Werner, 1992).

Comme toutes les bactéries Gram négatives, le *Rhizobium* libère dans le milieu environnant de petites quantités de Lipopolysaccharides (LPS) émanés de la membrane externe (Pelmont, 1995), dans le motifs sucrés (oligosaccharides) induit une spécificité antigénique (Leclerc, 1995).

Les exopolysaccharides sont d'une importance spéciale dans la spécificité et la caractérisation de la surface cellulaire. La voie d'Enter-Dondoroff est le mécanisme principal du métabolisme des carbohydrates. (Werner, 1992)

Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6-7 (Somasegaran et Hoben, 1994). Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C. Les de *Rhizobium* peuvent se développer à pH comprise entre 4,5 et 9,5 (Gordan, 1984).

V-3 Caractères génétiques

La génétique de *Rhizobium* n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose est les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulans les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (Patricia et al ; 1998 ; Raposeiras et al ; 2002).

L'ordre chromosomique et les gènes métaboliques dans le *Rhizobium* est généralement tout à fait différent de cela trouvé pour *E coli*, les gènes qui codent pour des fonctions similaires ne sont pas groupés, mais plutôt aléatoirement distribués dans le génome, le chromosome type de *Rhizobium meliloti* montre que les gènes codent pour la biosynthèse du tryptophane sont localisés sur trois régions différentes. (Werner, 1992)

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 méga plasmide (1 -2 Mb) et un plasmide de taille inférieur à 1 Mb (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 Nod, Nif et Fix sont groupés selon une distribution comparable d'un plasmide à l'autre. (Pelmont, 1995)

Chez certaines souches de *Rhizobium* jusqu'à 25% de l'ADN total est présent sous forme de plasmide. Tous les plasmides connus des *Rhizobium*, le plasmide sym(entre 100 Da et plus de 300M Da) est particulièrement remarquable (Werner, 1992), puisque les gènes responsables de la nodulation et de la fixation de l'azote dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique (Patricia et al, 1998), des gènes codent pour des bactériocines et de la production des pigments sont aussi présent (Werner, 1992).

La spécificité de l'hôte est codée par les gènes du plasmide sym, un échange dans ce plasmide signifie un échange dans la spécificité, de l'hôte (**Pelmont, 1995**).

Le génome de *Rhizobium* est complexe, contenant beaucoup de séquences répétitives d'ADN qui peuvent fournir des emplacements pour la recombinaison et des réarrangements génomiques. L'augmentation de la température, peut produire des délétions de plasmide et des réarrangements d'ADN ayant pour résultat la perte ou des changements des propriétés symbiotiques. En conséquence, cette instabilité génétique compromet l'utilisation des souches de *Rhizobium* dans la production commerciale d'inoculum (**Patricia et al, 1998 ; Raposeiras et al, 2002**).

V-4 Classification actuelle des Rhizobiums

Par convention, on nome « *Rhizobium* » toute bactérie, quelque soit son genre, qui est capable d'établir une symbiose avec légumineuse. La taxonomie des *Rhizobiums* est en changement permanent. Ceci est dû aux progrès technologiques dans chacun des trois critères utilisés en taxonomie : la morphologie, la physiologie et l'analyse des séquences jusqu'en 2003, 36 espèces rhizobiales étaient distribuées parmi 7 genres. On cite les genres suivants : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* (**F. Lazrek Ben Friha, 2008**)

Tableau 1: classification récente des rhizobia (Avril 2012)

Genre *Rhizobium*

<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	Lu et al. (2009b)

<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	Garcia-Fraile et al. (2007)
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	Lopez-Lopez et al. (2011)
<i>Rhizobium alkalisolo</i>	
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium qallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanese</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>Rhizobium loessense</i>	Anciennement “ <i>Rhizobium huanglingense</i> “
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu et al. (2008)
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitum</i>	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Confirmé en tant qu'espèce. Ramirez-Ramirez et al. (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium sullae</i>	Anciennement “ <i>Rhizobium hedysari</i> “
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al. (2001)
<i>Rhizobium undicola</i>	Anciennement “ <i>Allorhizobium undicola</i> “
<i>Rhizobium vignase</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. (2007)
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Chen et al. (2011)
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Anciennement <i>Rhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Anciennement <i>Rhizobium huakuii</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	Anciennement <i>Rhizobium loti</i>
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Anciennement <i>Rhizobium mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Vidal et al. (2009)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	Zhou et al. (2010)
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Lu et al. (2009)
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Anciennement <i>Rhizobium tianshanense</i>

V-7 Les Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes :

Les microorganismes de la rhizosphère trouvent dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucre, acides aminés, acides organiques, hormones.....etc. Certains de ces microorganismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des

infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont connues sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Marcel et al. 2001)

En fonction de leur degré d'association avec les cellules des racines des plantes ainsi que de leurs sites résidant, Les PGPRs peuvent être classés en deux groupes (Martinez-Viveros et al. 2010)

- **ePGPR** (Rhizobactéries rhizosphériques favorisant la croissance végétale) qui peuvent exister dans la rhizosphère, sur le rhizoplan, sur la surface des racines ou dans les cellules du cortex racinaire. Ils ne produisent pas de nodules, mais favorisent la croissance des plantes (Gray et Smith, 2005). Les genres bactériens tels que : *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter* *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* et *Serratia* appartiennent à ce groupe de bactérie (Gray et Smith ,2005). Ce groupe de bactérie correspond aux PGPR.
- **iPGPR** (Rhizobactéries endophytes favorisant la croissance des plantes) qui vivent à l'intérieur des cellules végétales, produisent des nodules (cas des *Rhizobium* avec les légumineuses), et sont localisés à l'intérieur des structures spécialisées. (Khan, 2005). Ce groupe de bactérie comprend des genres bactériens tels que : *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*... etc. (Wang et Matinez-Romero, 2000), ce groupe de bactéries correspond aux bactéries symbiotiques.

V-8 Mode d'action des PGPRs

Selon Glick et al. (1999) les mécanismes généraux de la promotion de la croissance des plantes par PGPR comprennent la fixation d'azote, l'abaissement du taux d'éthylène, la production de sidérophores et de phytohormones, l'induction de la résistance aux pathogènes, la solubilisation des nutriments, la diminution de la toxicité des polluants, etc.

Castro et al. (2009) suggèrent que les souches PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes et le développement, soit par des mécanismes directs ou indirects.

La stimulation directe inclut la fixation de l'azote (Ardakni et al. 2010), la production de phytohormones telles que les auxines, les cytokinin (Castro et al., 2008) et gibbérellines (Narula et al., 2006), la solubilisation des minéraux comme le phosphore et le fer (Hayat et al.,2010),

la production de sidérophores et des enzymes et l'induction de la résistance systématique (**Pathma et al., 2010**).

Cependant la stimulation indirecte est fondamentalement liée à la lutte biologique, y compris la production d'antibiotiques, la chélation du fer disponible dans la rhizosphère, la synthèse d'enzymes extracellulaires pour hydrolyser la paroi cellulaire fongique et la compétition pour les niches au sein de la rhizosphère (**van Loon, 2007**). Les souches prometteuses de la stimulation indirecte (**Damayanti et al. 2007**). Outre, la transformation de l'azote et l'augmentation de la biodisponibilité du phosphore, l'acquisition du fer, l'exposition de l'activité enzymatique spécifique et la protection des plantes contre les pathogènes nuisibles par la production d'antibiotique peut également améliorer la qualité des cultures dans l'agriculture (**Spaepen, et al., 2007**). La figure 04 résume les différents mécanismes d'action des PGPRs.

VI-Génétique de la nodulation

VI-1 Les gènes de la nodulation *nod*

Les gènes *nod* portés par le *Rhizobium* et le *Bradyrhizobium*, sont les gènes de symbiose les plus spécifiques pour le microsymbionte, permettant la communication avec la plante hôte pour former les nodules. (**Zhang et al, 2000**)

❖ Les gènes *nod D*

Les gènes *nod D* ont été suggérés jouer un rôle dans la spécificité de l'hôte. La différence dans la réponse des gènes *nod D* aux flavonoïdes libérés par la plante hôte, suggère qu'il existe 3 copies des gènes *nod D* (*nod D1*, *nod D2*, *nod D3*) ce qui constitue un avantage pour l'augmentation de l'interaction avec différentes plantes hôte. (Lucinda, 1998)

Les gènes *nod D* sont activés par des différents flavonoïdes et flavones, les protéines Nod D activent l'expression des gènes de nodulation du *Rhizobium* en se fixant sur leurs promoteurs spécifique assez long (50 paires de base) appelé « nod box »(fig 6) (**Debellé et al., 2001,Pelmont,1995**)

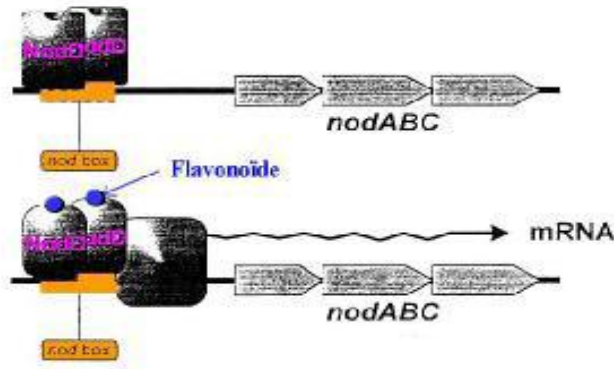


Figure 06 : Régulation du facteur Nod D

❖ Les gènes *nod ABC* :

Appelés aussi les gènes communs présents chez tous les Rhizobium, sont des gènes interchangeables, nécessaires pour la formation du curling et pour déclencher une série de division des cellules végétales (Sharma et al., 1993, Gage, 2004) .

nodC code pour une protéine qui s'incorpore sur la membrane de la surface bactérienne et peut intervenir dans le déplacement de la bactérie vers la plante. NodA et NodB peuvent produire des composants à faible poids moléculaire favorisant la croissance des plantes, en stimulant la division cellulaire (Gage ,2004)

❖ Les gènes *nod* de la spécificité de la plantes

Un grand nombre de gènes *nod* détermine la spécificité de la plante hôte. ces gènes sont appelées aussi les *hns* (host spécificité of nodulation), ils sont des gènes non interchangeable entre les souches ; exemples : *nodH*, *nod EGF*, *nod PO*, et *nod C* qui est une protéine membranaire. Une mutation au niveau de ces gènes a pour effet de provoquer un changement de la spécificité de la souche à son hôte ; exemple : la mutation au niveau des gènes *nod E* et *nod F* peut réduire ou retarder la nodulation de *Rhizobium léguminosarum*. (Pelmont, 1995)

Les trois premiers (*nod ABC*) servent à constituer le polysaccharide qui comportera selon le cas 4 à 5 unités glucidiques, les gènes *nod H* et *nod Q* servent à diriger le griffage du sulfate sur le polysaccharide. La protéine *nod H* est simplement une transférase qui ajoute

Le groupe sulfate à une position déterminée sur l'oligosaccharide (fig 7). (Zhang et al., 2000. Debelle et al., 2001).

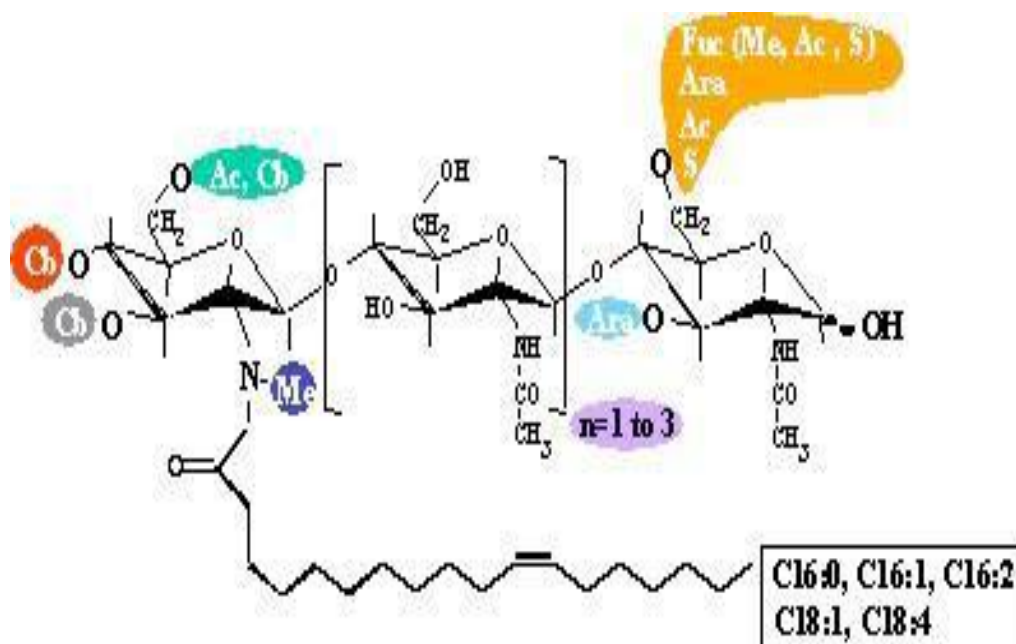


Figure 07 : Structure des facteurs Nod.

Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques substitutions observées chez les différentes espèces de rhizobia indiquées en couleur. Les variations les plus courantes de la chaîne d'acides gras sont également représentées : Ac (Acétyle), Ara (Arabinosyl), Cb carbonyle, Fuc (Fucosyl), Me (Méthyle), S (Sulfuryl). (Cullimore et col, 2001)

❖ Les gènes *nod O*

Nod O est une protéine sécrétée par la souche de *Rhizobium leguminosarum bivar vecea* qui joue un rôle dans la signalisation durant la nodulation des légumineuses. Son rôle est de

former des pores sur les membranes et déterminer une gamme d'hôtes (**Finnie, 1997. Gage, 2000**).

Cette protéine semble jouer un rôle dans la détermination de la spécificité de l'hôte avec les facteurs *hsn*, elle est également essentielle pour la synthèse d'autres facteurs de nodulation (**Werner, 1992**).

VI -2 Les gènes de la fixation de l'azote *nif* et *fix*

❖ Les Gènes *nif*

La synthèse de la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Hopkins, 2003). Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase ; *nifH*, *nifD*, *nifK* dont *nifH* code pour la réductase et *nifD* et *nifK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995). Aussi les gènes par exemple, *nifB*, *nifE* sont impliqués dans la synthèse du cofacteur FeMo qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (Brewin et coll., 1992).

❖ Les Gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote. (Brewin et coll., 1992 ; Hopkins, 2003)

VI-3 Autres gènes

Les gènes affectant les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides (*exo* et *lps*) et les déterminants pour la prise d'acide dicarboxilique par les bactéroïdes (*dct*) peuvent être nécessaire pour la symbiose mais pas uniquement exprimés en état symbiotique (Brewin et coll., 1992).

VI-4 Les étapes de la nodulation

VI-4-1 Préinfection

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka et col, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances de type flavonoïdes et isoflavonoides, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape et col. 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado et col. 1995).

Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes *nod* bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod, des lipochitoooligosaccharides (Perret et col, 2000).

Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte ;

La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures ; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui enferme les *Rhizobium* (Wais et col, 2002). Elle fait intervenir des changements dans

L'arrangement des microtubules (Timmers et col, 2007) ; plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Wood et Newcomb, 1989).

VI-4-2 Infection :

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité.

VI-4- 3 Développement du nodule

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi., 2000). Les nodules de type indéterminé (*Medicago*

truncatula, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe.

La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de

type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée. Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers et col, 1999). Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules

pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius et col, 2000).

De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de préinfection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel et col, 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation. L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudonodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule. De plus, les facteurs Nod produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante.

Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus mais il semble que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine (Mathesius et col, 1998 ; Boot et col, 1999) et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Mathesius et col, 2000a). Les flavonoïdes sont susceptibles de provoquer l'accumulation de l'auxine en réduisant son oxydation de manière directe (substrats de l'enzyme) ou indirecte (en réagissant avec H₂O₂ ; Mathesius, 2001). Leur rôle dans

l'inhibition du transport de l'auxine est également supposé (Brown et col, 2001). Des travaux récents montrent que l'extinction par la technique d'ARN interférent de l'expression du gène de la chalcone synthase (CHS) chez *M. truncatula* entraîne une augmentation du transport de l'auxine associée à une inhibition de la nodulation (Wasson et col, 2006)

VI-4-4 Structure du nodule

L'infection du nodule indéterminé se fait par sa base, ce qui établit un gradient de différenciation et définit plusieurs zones :

- la **zone méristématique** (zone I) située à l'apex. Cette zone est toujours dépourvue de bactéries.
- la **zone de préfixation** (zone II) qui contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème et qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroidienne, et leur différenciation en bactéroïdes commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.
- L'interzone II-III dans laquelle la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplast.
- La **zone de fixation** (zone III) où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- La **zone de sénescence** (zone IV) qui est présente chez les nodules âgés.

Les nodules de Légumineuses présentent une structure similaire à celle d'une tige avec les tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par les Rhizobia. De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve :

- le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses
- le cortex moyen
- les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle
- le cortex interne formé de une à trois couches de cellules
- le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les rhizobia et des cellules non infectées. (Fig 8)

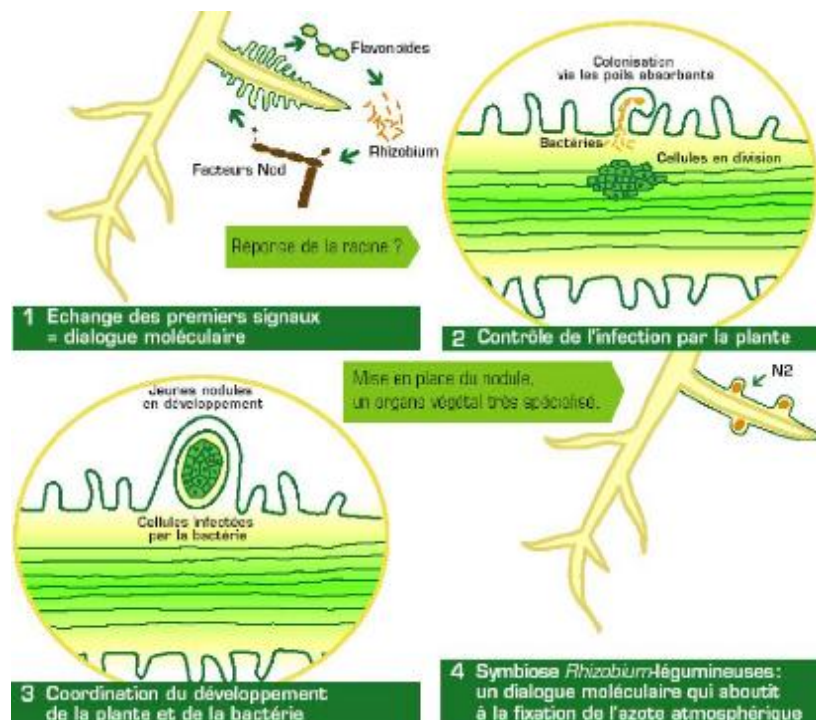
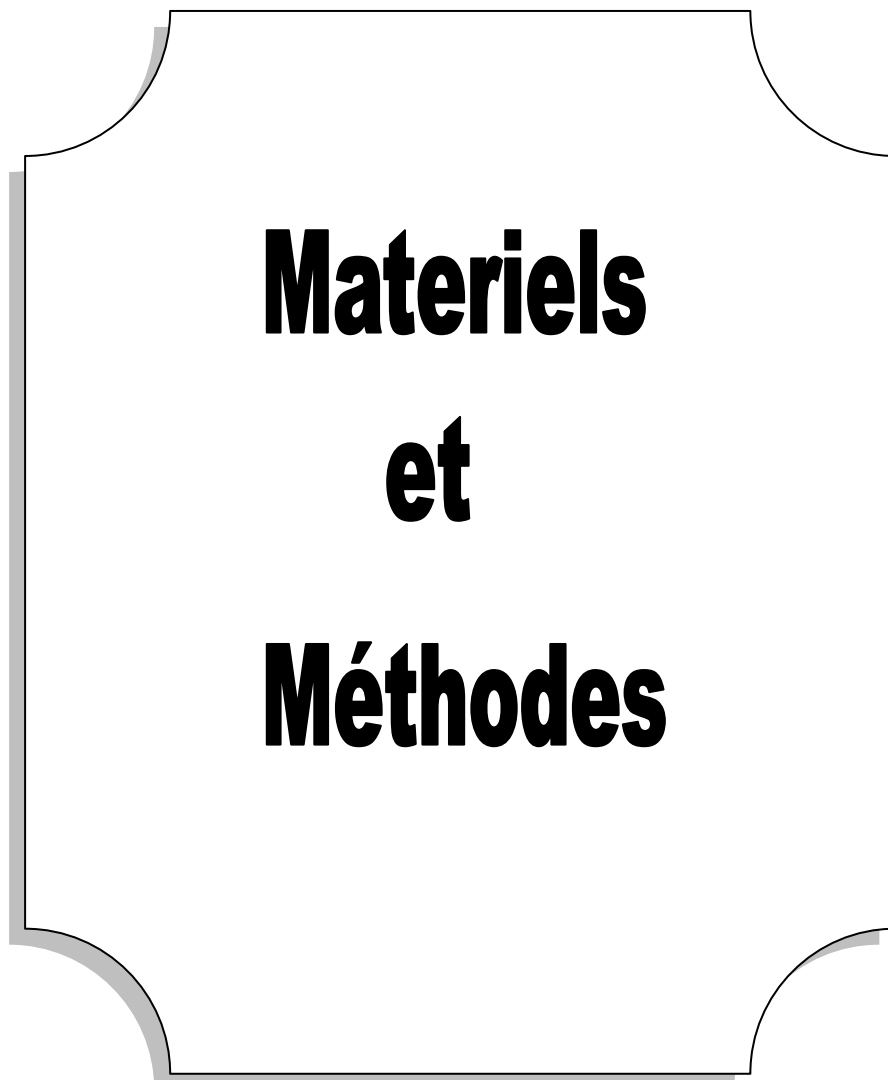


Figure8 : Les étapes de formation d'un nodule indéterminé (Foucher et Kondorosi

2000)



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* d'origines diverses.

Tableau N°2 – Isolats et Souches de référence utilisés

Souche	Affiliation par le 16S	Similarité	Origine
Sam22	<i>Rahnella aquatilis</i>	96%	Constantine
Sam66	<i>Rahnella aquatilis</i>	95%	Biskra
Sam69	<i>Rahnella aquatilis</i>	97%	N'gwaous
Sam99	<i>Rahnella aquatilis</i>	93%	Batna
Sam112	<i>Rahnella aquatilis</i>	93%	Jijel
Sam102	<i>M.ciceri</i>	98%	Constantine



Photo 1 : la légumineuse *cicer arietinum* récoltée du site de Messaoud Boudjriou
(Ain Ikarma) Constantine

La collecte des nodules est réalisée selon la technique préconisée par Vincent, J.M. (1970) et Somasegaran, P. et J. 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 toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet (Photo 12 et 13)



Figure 12 - Collecte des nodules (Photo D.P. Beck, 1993)



Figure 13 : Rinçage des racines et nodule

I-2- Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le chlorure de Calcium (Ca Cl₂) (Vincent, J.M., 1970).



Figure 14 : Conservation des nodules

Sur chaque flacon est mentionné le nom de la plante, date et lieu de collecte, et la date de conservation.

I-3- Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, J.M. (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, Vincent, J.M., 1970) 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 mêmes nodules sont ensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA au BCP. Annexes 1). Les boîtes sont incubées trois jours à 28°C.

II-Test de nodulation

L'habilité des microorganismes à nodules et à fixer l'azote avec la plante-hôte est un caractère important et pratique pour les rhizobia ou B.N.L. (bactéries nodulans les Légumineuses) et doit être analysé en détail (Graham et coll.1991). Les tests de nodulation doivent être conduits dans des jarres traditionnelles de Leonard (Vincent, 1970) ou dans des tubes appropriés (Beck et coll. 1993). Après l'isolement et les caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques et physiologiques, une première approche pour identifier les isolats est leur capacité et aptitude à former des nodules avec la plante-hôte, *Cicer arietinum*, en conditions bactériologiquement contrôlées.

II-1 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 laissées séchées sous la hotte. La partie supérieure de chaque jarre est remplie par un mélange de vermiculite-sable alors que la partie inférieure est remplie de solution nutritive (Annexe 1). Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse ce qui permet d'humidifier le mélange par capillarité avec la solution nutritive. A la fin de la préparation on couvre les jarres du papier aluminium durant les premiers jours.



Figure15 : Jarres de Léonarde

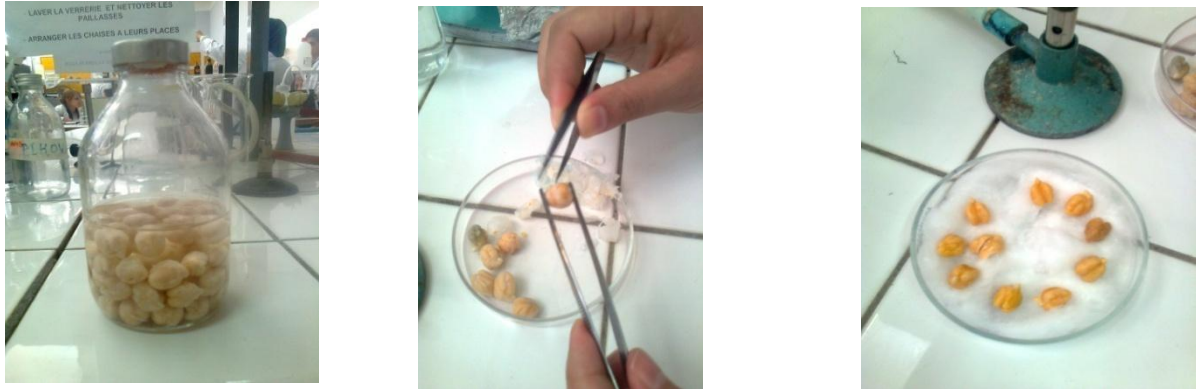
II-2 Préparation du sable

Le sable de rivière est lavé jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée. Puis le sable est autoclavé à 120°C pendant 20mn.

II-3 Stérilisation des graines

Sous la hotte à flux laminaire, les graines placées dans des tubes stériles sont stérilisées à l'éthanol 95 % pendant 10 secondes puis par une solution d'eau de Javel concentré pendant 10mn. Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile. On les laisse imbiber dans le dernier rinçage pendant 1 heures.

Les graines stériles sont mises en germination sur des boîtes de Pétri en verre stériles contiennent du coton imbibé. Les boîtes sont enveloppées avec du papier aluminium et mises à germer dans l'obscurité.



A

B

C

Figure16 : Stérilisation des graines

A : flacon doté des graines dans l'eau distillée stérile

B : escarrification mécanique des graines

C : boîte de Pétri 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 à 3 graines par jarre, puis inoculées immédiatement avec 2 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} \approx 1$). 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.

III- Caractérisation enzymatique des isolats

III-1- Recherche des enzymes spécifiques :

Le but est de rechercher la présence de certaines enzymes qui jouent un rôle lors du processus d'infection (nodulation) des racines par les bactéries, particulièrement la

polygalacturonase, la cellulase, la nitrate-réductase et à un degré moindre l'uréaseq, et la présence d'une β -galactosidase.

III-1-1-Hydrolyse de l'urée

Elle est mise en évidence en cultivant les isolats sur milieu YMA (Annex1) contenant 2% d'urée et 0,012g/L de rouge de phénol comme indicateur de pH à 28° C pendant 48h .La solution de l'urée est stérilisée par filtration (0,20) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45° C sous la hotte à flux laminaire .

Le virage de couleur vers le rose représente l'alcalinisation du milieu et l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative



Figure 18 :ensemencement des boites de Pétri contiennent le milieu YMA+Urée

III-1-2- Activité cellulosique

L'activité endoglucanasique est déterminée en ensemencant les souches sur milieu YMA additionné de 0,25% de CMC (Carboxyméthylcellulose).

Après incubation à 28° C pendant 5 jours les boites sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies par une solution de rouge Congo (1mg /ml) et incubées dans l'étuve à 28° C pendant 30 min. Ensuite cette dernière est remplacée par la solution d'Na Cl 1M et les boites sont abandonnées 30 min à température ambiante puis vidées. La présence de l'enzyme est caractérisée par l'apparition d'un halo jaune –orangé entourant les colonies.



Figure19 : boites nonensemencées contiennent le milieu YMA+CMC

III-1-3- Réduction des nitrates

La détection de la nitrate-réductase s'effectue en inoculant un bouillon TYB +KNO₃ (Annex1) avec les souches.

Après incubation à 28° C pendant 4 jours, on rajoute 3 à 4 gouttes de chacun des réactifs nitrate réductase.

NR1 : Acide sulfanilique dans l'acide acétique.

NR2 : α -naphtylamine dans l'acide acétique.

L'apparition d'une coloration rouge indique que les souches possèdent une nitrate réductase ; sinon, on doit rajouter la poudre de zinc et on observe la nouvelle couleur (la couleur rouge indique la non réduction des nitrate, alors qu'un milieu incolore indique que le state nitrate est dépassé, donc la souche possède la nitrate réductase).

III-1-4- Recherche de lipase

Une boîte de Pétri contenant le King B (Annex1) additionnée de tween 80 à 16ml/L (monoliate de sorbitol) estensemencée en piqûre (ou par spot) à partir d'une culture en milieu solide de la souche étudier .Incuber 24 à 48 heures à 37° C

Après incubation les colonies de souches lipase(+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse.



Résultats

et

Discussion

I-Aspect Morphologique

I-1 Observations des colonies et conservation des isolats

Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sur milieu YMA et n'ayant pas acidifié le milieu GPA (virage du BCP au jaune) sont prises en considération. Ces colonies, propres aux bactéries nodulant les Légumineuses, en particulier le genre *Hedysarum* (Benhizia et col, 2004 ; Torche, A., 2006). Une observation microscopique (coloration de Gram) et un examen morphologique des colonies sur milieu YMA sont réalisés sur les isolats avant d'être conservés sur YMA tamponné avec du CaCO₃ (3g/l) en tube incliné (Vincent, J.M. ; 1970 ; Beck et col.1993). Après incubation les souches sont stockées au réfrigérateur en vu de leur caractérisation. (Photo 6 :A et B)

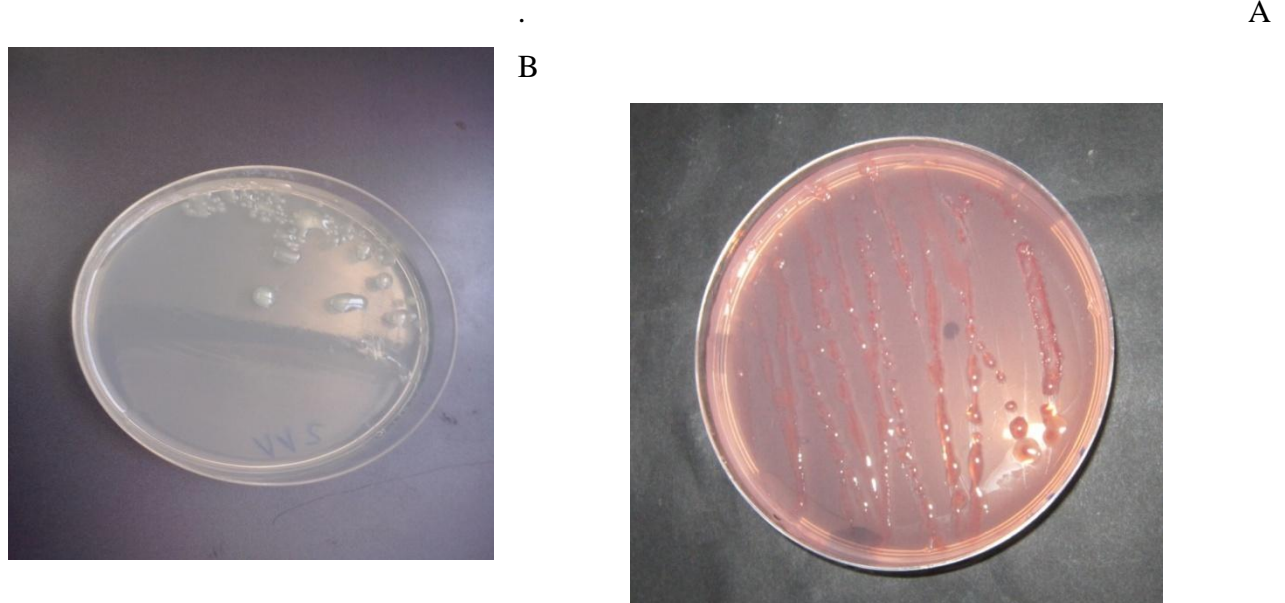


Figure 06 : Aspect des colonies

A : Aspect des colonies sur milieu YMA

B : Aspect des colonies sur milieu YMA+ rouge Congo

II-Teste de nodulation

La technique préconisée par Vincent (1970) a été suivie, les graines ont germé après stérilisation avec l'eau de javel concentré, les graines germées (après 48h dans l'obscurité) sont plantées dans les jarres et inoculées par les différentes souches à phase exponentielle de croissance et mise dans la chambre de croissance sous lumière périodique.

Au cours du teste les plantes n'ont pas survécu et par conséquent aucune nodulation n'est observée.



Photo 7 : Jarres contiennent des plantes mortes

III-Recherche d'enzymes spécifiques

III-1 Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à l'hydrolyse l'urée a été initialement décrite par Jarvis et al ., (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur du pH.

L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

Toutes nos souches alcalinisent le milieu à base d'urée en donnant des colonies rouge (Figure23). Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998)



Photo 8 : : Activité uréasique.

III-2 Activité cellulosique

An halo jaune-orange autour des colonies indique la présence d'une endogluconase (Figure24). Toutes les souches ont présenté une réaction positive. Ceci montre que les rhizobia produisent l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, ce qui facilite la pénétration des rhizobia à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et al., 1992).



Photo 9 : Teste de cellulase

III-3 Réduction de nitrate

L'observation d'une couleur rouge signifie que nos souches possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites. Un résultat négatif est confirmé par l'ajoute de la poudre de zinc et en observe une couleur rouge (la couleur rouge indique la non

réduction des nitrates, alors un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche possède la réductase).

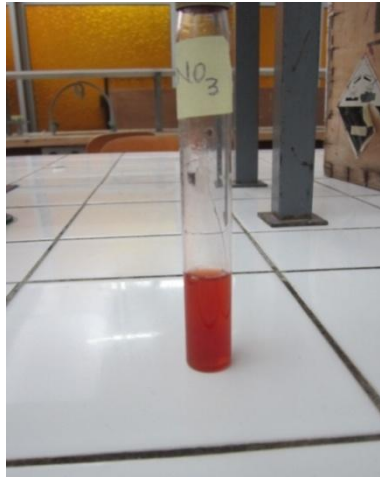


Photo 10 : Teste de réduction de nitrate.

III-4 Teste de lipase

De nombreuses bactéries douées d'activité lipolytique et estérasique. Les graisses sont décomposées en acides gras et glycérol par une enzyme appelée la lipase

Les lipases sont des enzymes constitutives, extracellulaire, capables d'hydrolyser les lipides.

Les souches lipase positif donnent la présence d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse. Toutes nos souches testées donnent des résultats positifs ceci est exprimé par la photo.



Photo 11: Teste positif de la lipase

Conclusion

Six souches bactériennes ont été isolées à partir des nodules de la légumineuse *Cicer arietinum* cultivée dans des sites différents de l'Algérie dont cinq sont des *Rahnella* et une *Mesorhizobium ciceri* comme souche de référence.

Les isolats présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et culturales appartenant aux genres *Rhizobium*, ce sont des bactéries à croissance rapide selon leur aspect sur le milieu YMA, elles absorbent très peu le colorant rouge congo.

La technique préconisée par Vincent (1970) a été suivie, les graines germées (après 48h à l'obscurité) sont plantées dans les jarres et inoculées par les différentes souches à phase exponentielle de croissance et mises dans la chambre de culture sous lumière périodique, après deux semaines on a raté le test parce que les plants sont morts.

En cultivant les isolats sur milieu YMA (Annex1) contenant d'urée, montre la disposition de l'enzyme de l'uréase par un virage de couleur du milieu vers le rose.

L'activité endoglucanasique est déterminée en ensemençant les souches sur milieu YMA additionné de CMC (Carboxyméthylcellulose), un halo jaune-orange autour des colonies indique la présence d'une endoglucanase. Toutes les souches ont présenté une réaction positive. Ceci montre que les rhizobia produisent l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, ce qui facilite la pénétration des rhizobia à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire.

La détection de la nitrate-réductase s'effectue en incubant les souches dans un bouillon TYB +KNO₃, L'observation d'une couleur rouge signifie que nos souches possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites. Un résultat négatif est confirmé par l'ajout de la poudre de zinc et on observe une couleur rouge.

Le test de lipase : Une boîte de Pétri contenant le King B additionnée de tween 80 (monoliate de sorbitol) est ensemencée en piqûre à partir d'une culture en milieu solide de la souche étudiée. Les souches lipase positif donnent la présence d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse. Toutes nos souches testées donnent des résultats positifs.

A partir de nos résultats on a conclu que les souches *Rahnella* possèdent les enzymes nécessaires pour la nodulation (Uréase, cellulase, lipase, réductase).

- **King B (Camille Dellarras,2007)**

La composition :	g/l
-Peptone	20g
-Glycérol	15ml
-Phosphate Bipotassique anhydre (K ₂ HPO ₄)	1,5g
-Agar	20g
-Sulfate de magnésium (MgSo ₄ , 7H ₂ O)	1,5g
-L'eau distillé	1000ml

PH 7,02 +/- 0,2

- **Yeast Mannitol Agar Rouge congo**

(YMA+RC)

Pour 1l :

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

PH 6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min après une addition du rouge congo (0,25g de R.C dans 100ml H₂O D)

- **Carboxyméthyl cellulose**

(CMC)

Pour préparer 1l :

-Mannitol	10g
-K ₂ HPO ₄	0,5g
-MgSo ₄ , 7H ₂ O	0,2g
-Na Cl	0,1g
-Extrait de levure	0,5g
-Agar	15g
-CMC	2,5g

PH 6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

- **Tryptone Yeast Agar**

(Ty)

Pour 1l :

-Tryptone	5g
-Extrait de levure	1g
-Ca Cl ₂ 2H ₂ O	0,87g
-H ₂ O distillé	1000ml
-Agar	12g

PH 6,8

Autoclavage à 120°C pendant 20 min

- **Yeast Mannitol Agar**

(YMA)

Pour 1l :

-Mannitol	10g
-K ₂ HPO ₄	0,5g
-MgSo ₄ , 7H ₂ O	0,2g
-Na Cl	0,1g
-Extrait de levure	0,5g
-Agar	15g

PH 6,8



Références

Bibliographique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen E. K., and O.N. Allen.** 1981. The leguminosae: A source book of characteristics .user and nodulation. Madison: University of Wisconsin press, 812pp
- Andriankaja, A.H.** (2002)- Mise en évidence des opportunités de développement de la riziculture adoption du Sri, et évaluation de la fixation biologique de l'azote. Université d'Antananarivo.
- Aouani M. E., Mhamidi R., Jebara M. et Amargerb N.** (2001). Characterization of rhizobia nodulating chickpea in tunisia. *Agronomic*. 21: 577-581.
- Ardakani .S.S ,Heydari .A, Tayebi .L et Mohammedi. M,(2010),** Promotion of cotton seedling growth characteristics by developpement and use new bioformulations, int J Bot 6(2) ;95-100.
- Bacha F(1998).**Etition de de l'effet du stress hydrique sur la nutrition azotée du pois chiche (*cicer aritinum L*). In *Actes : séminaire national sur les légumineuses almentaires*, pp. 100-117. Eds. Labdi M., Maatougui M. E. H., Bouznad Z., Benabdelli K.et Benssadik B.
- Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993.** - Pratical *Rhizobium*- Legume Technology Manual . ICARDA.Syria.
- Benguedour, A. (2000)-** étude de la symbiose Rhizobium-Hedysarum coronarium : essai de caractérisation de l'espèce Rhizobium « hedysari ». Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie .
- Berge, Odile, Lodhi, Asma, Brandelet, Geraldine, Santaella, Catherine, Roncato, Marie-Anne, Christen, Richard, Heulin, Thierry, Achouak,Wafa** 2009 *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. Int J Syst Evol Microbiol 59: 367-372.
- Beyerinck, M.W.** 1888. Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Zeitung* **46**, 725-804
- Boivin, C., Giraud, E. ,L.R., Malpica,C.A., and Rosenberg, C.** (1997) - Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trgonelline, a secondary metabolite presente in legumes. Journal of Bacteriology. **173(9)**: 2809-2817.
- Bouznad Z. corbiere R. El Biari A., larbi M .8 Maatougui M.H.(1998)** .L'anthracnose du pois chiche (*cicer aritinum L.*) en Algérie et la recherche de cultivars résistants . In *Actes : séminaire national sur les légumineuses alimentaires* ,pp .162-172. Eds. Larbi M., Maatougui M.E.H, bouznod Z., benaddelli K. 8 Benssedik B.

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. **3**: 239-248

Brewin N. J., 2002. - Pods and Nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. *Biologist.Rev.* 49 (3).

Castro. R. O, Cantero . E.V et Bucio . J. L,(2009), Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling, *Plant Signal Behave* 4(8) :701-712.

Corbière, H.L.F (2002)-The importance of sucrose synthase for AM symbiosis in maize, in <pea and in Medicago. These de doctorat

Damayanti . T.A, Pardede. H et Mubarik .N.R , (2007) , Utilization of root colonizing bacteria to protect hot-pepper against Tobacco Mosaic Tobamovirus , *Hayat J Biosci* 14(3) :105-109.

Debellé . F, L. Moulin, B. Mangin, J. Dénarié, C. Biovin (2001)- nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica polonica . Minireview.* Vol.48No. 2/2001 359-365.

De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607-619.

Deléglise, A. (2001)- Vers une diminution de l'utilisation d'engrais azoté ?. ouébec science

Dénarié, f. Debellé, C. Rosenberg (2004)- Identification de deux gènes de légumineuse contrôlant des symbioses d'intérêt agronomique INRA, CNRS.

Dénarié, J. (2004)- Des symbioses d'une grande importance écologique et agronomique. La lettre n° 11/ printemps 2004 de l'Académie des sciences

Drevon, J.J., P. Hinsinger (2004)- Nutrition phosphatée et réponse des plantes et de la symbiose rhizobienne à la déficience en phosphore.

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

Dreyfus B, Kersters K, Collins MD, Gillis M (1994) Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobium* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *International journal of Systematic Bacteriology*, 44, 461-473.

Dupuy N, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Vandenbruaene I, Maestrojuan G,

Fang, Y., Hirsch AM (1998) Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* **116**: 53-68.

F. Lazrek Ben Friha 2008-Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago tuncatula* et recherche de QTL liés au salin. Thèse doctorat. Université de Toulouse, Paul Sabatier. pp.214

Finnie C, Hartley NM, Findlay KC, Downie JA. (1997)-The *Rhizobium leguminosarum* *prcDE* genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification *Mol Microbiol.* 1997 Jul; 25(1):135-46.

Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., and Downie, J.A.(1993) - Resistance to nodulation of Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates and O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.***10**: 351-360.

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

Gage, D. et W. Margolin (2000) - Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology*, 3(6): 613-7.

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

Garcia- Fraile, Paula, Rivas, Raul , Willems, Anne, Pex, Alvaro, Martens, Miet, Martinez-Molina, Eustoquio, Mateos, Pedro F., Velazquez, Encarna. (2007) –*Rhizobium cellulositicum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba* nt *J Sys. Evol. Microbiol.***57**:844-848.

Gausсен H., Leroy J.F , Ozenda P. (1982). *Précis de botanique des végétaux supérieurs* , pp.329.Ed. Masson.

Gepts P, Beaves WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legume as a model plant family. Genomic for Food and Feed Report of the Cross - Legume Advances through Genomic Conference. *Plant Physiology* 137: 1228-1235

Gordan, D.C. (1982) – transfert of *Rhizobium japonicum* Buchanan to *Bradyrhizobium* gen. nov. A genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int.J. syst.Bacteriol.***32**: 136-139

Gordan, D. C. 1984 – Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. P. 234-254. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). Berge's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wilkins Co. Baltimore.

Gordan M.(2001). Pois chiche : situation et respectives ,*Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada*. Vol 14, N°1.

Gordon M., (2002a). les légumineuses au moyen –orient et en Afrique du Nord. Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada. Vol 15,n° 5.

Gordon M.(2002b) .Pois chiches : situation et perspectives. Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada. Vol 15, N°16.

Gardon , M.(2006) Pois chiches : sition et perspevtivement. Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada. Vol 19,n°13.

Graham PH, Sadowsky MJ, Keyser HH et al. (1991) Proposed minimal standars for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. International journal of systematic and Evolutionary Microbiology, **41**, 582-587

Graham P. et C. Vance (2003)-Legumes: importance and contraintes to greater use. Plantphysiol. 131:872-877.

Gray E.J et Smith.D. L,(2005) , Intracellular and extracellular PGPR :commonalities and distintions in the plant-bacterium signaling processes , Soil Biol Biochem 37 :395-412.

Grosjean. C, T. Huguet. (1997)- A persistent meristem is formed in nodular structure elicited by Nod facture or by a Rhizobium meliloti exopolysaccharide mutant in alfalfa plants which modulate spontaneously plant Science 127 (1997)215-225

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

Hayat .R, Ali . S, Amara. U, Khalid .R, et Ahmed. I,(2010), Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion : a review, Ann Microbiol 60(4) : 579-598.

Hirsch AM, Lum MR et Downie JA (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis sospecial? Plant Physiol. **127**: 1484-1492

Hopkins, W. G. (2003) - Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck. P 99-120.

Idrissi L., 2006: Etude et développement de nouvelles méthodes électrochimiques pour la détermination des ions orthophosphate, nitrite, nitrate, et ammonium. Thèse de doctorat d'état de l'université Mohammed V Agdal. Maroc.

khan A. J., (2005), Role of soil microbes in the rhizosphere of plant growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *JT race Elem Med Biol* 18 :355-887.

Larbi M.(1991). Perspectives de développement des légumineuses annuelle dans les systèmes céréaliers des zones semi-arides. *Rev . Céréaliculture* ,n°25,pp.12-15. Ed. I T G C S .B . Abbes .

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

Larbi M.(1991). Perspectives de développement des légumineuses annuelle dans les systèmes céréaliers des zones semi-arides. *Rev . Céréaliculture* ,n°25,pp.12-15. Ed. I T G C S .B . Abbes .

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

Lin, Dong Xu, Chen, Wen Feng, Wang, Feng Qin, Hu, Dong, Wang, En Tao, Sui, Xin Hua, Chen, Wen Xin . 2009. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009 59: 1919-1923

Lindström K, Z. Terefework, L. Suominen, G. Lortet (2002) - Signaling and development of *Rhizobium-legume* symbiosis. *biology and environment: Royal Irish Academy* vol. 102B, NO. 1, 61-64

Lloret L, Ormeno-Orrillo E, Rincon R, Martinez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, Martinez-Romero E. (2007) *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol*.

[LÓPEZ-LÓPEZ (A.), ROGEL (M.A.), ORMEÑO-ORRILLO (E.), MARTÍNEZ-ROMERO (J.) and MARTÍNEZ-ROMERO (E.): *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2010, **33**, 322-327.]

Lu YL, Chen WF, Han LL, Wang ET, and Chen WX (2009). *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 3006-3011.

Lucinda S. S, R. L. Sharon (1998)- Requirements for *syrM* and *nod* Genes in the nodulation of *Medicago truncatula* by *Rhizobium meliloti* 1021 MPMI Vol. 11, No. 9, 1998, pp. 937-940.

Maatougui M.H.(1998). Le développement du secteur stratégique des légumineuses alimentaires. *Rev. céréaliculture*, n° 25 ,pp.12-14.Ed. I T G C S.B. Abbes.

Mantelin,S, Fischer,M, Zakhia,F, Gilles,B,Sophie,B, deLajudie ,(2006) Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp.nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56 (4): 827

Martinez-Viveros ; O, Jorquera .M . A, Crowley . D.E ,Gajardo. G et Mora. M . L,(2010), Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria , *J Soil Sci Plant Nutr* 10 :293-319.

Mathesius U, Schlaman HR, Spaink HP, Of Sautter C, Rolfe BG et Djordjevic MA (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white

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

Mateos P F, Jose I, Jimenez-zurdo, Jin chen, Squartini A, Martinezmolina S, Hubbell D H, Aasso F B. 1992. Cell-Associated Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifoli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol: 58 N6, PP 1816-1822.

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* 59: 2140-2147

Narula .N ,Deubel .A ,Gans. W, Behl. R.K et Merbach..W,(2006), Para nodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil, *Plant soil Environ* 52(3) :119-129.

Nour S. M, Fenandez M. P. Normand P. et Cletet-Marel J. C., 1944. *Rhizobium Ciceri* sp. Nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium Mediterraneum* sp. Nov. *Int. J. Syst Bacteriol* 45: 640-648.

Nour S. M, Cletet-Marel J. C., Fenandez M. P. et Normand P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 511-522.

Patriarca EJ, TatéR, Ferraili S et Iaccarino M (2004)-Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.*234:201-26

Patricia P. Pinto, Ruy Raposeiras, Andrea M. Macedo, Edilson Paiv, Nadja M.H.Sà (1998) – Affects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modification of bean nodulating *Rhizobium* strains. *Revista de Microbiologiei.* 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.* **58**, 2158-2163.

Perret, X.; Staehe Lin, C., and Selander, R.K., (2000) – Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.***64**: 180-201.

Phathma. J, Kennedy. R.k et Sakthivel .N, (2011), Mechanisms of *fluorescent pseudomonads* that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plant. In : Maheshwari DK (ed) *bacteria in agrobiolgy : plant growth responses*, Springer Berlin, p : 77-105.

Pingret, J. L., E.P. Journet., D.G. Barker (1998)- *Rhizobium* Nod factor Signaling: Evidence for a G protein-Mediated Transduction Mechanism. *Plant Cell*, Vol. 10, 659-672.

Ramirez,B, Martha H, Garcia-F, Paula, Peix, Alvaro, Valverde, Angel, Rivas, Raul, Igual, Jose M., Mateos, Pedro F. (2008) .Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2484-2490.

Ramirez, B., Martha, H., Peix, Alvaro, Rivas, Raul, Camacho, Maria, Rodriguez-Navarro, Dulce N., Mateos, Pedro F., Martinez-Molina, Eustoquio, (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. Int J Syst Evol Microbiol 59: 1929-1934

Raposeiras, R. Patricia P. Pinto ; Raul V.M. Passos ; Lucy Seldin ; Edilson Paiv ; M. Rita Scotti; Nadja M.H. Sà (2002) – Variability of isolated colonies in bean nodulating Rhizobium strains before and after exposure to high temperature. Brazilian Journal of Microbiology. Print ISSN 1517-8382

Rasanen, L. (2002)-Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* these de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

Ren, Da Wei, Chen, Wen Feng, Sui, Xin Hua, Wang, En Tao, Chen, Wen Xin. 2011. *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China. Int J Syst Evol Microbiol 61:1912-1920

Sharma.P.K, B.S. Kundu, R.C. Dogra (1933)- Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. Biotech.Vol. 11, pp. 741-779

Somasegaran. P et Hoben H. J (1994) - Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc. p.450

Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J et May GD (2006)-Genetic and functional genomic of legume nodulation. *Curr Opin PlantBiol*.9:110-121

Speapen. S, Vanderleyden. J et Remans .R,(2001),Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling , In :Uden F (ed) FEMS microbial rev, Blackwell Publishing Ltd, new York p :1-24, doi :10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.

Tan, Z.Y., Kan, F.L., Peng, G.X., wang, E.T., Reinhold-hurek, B andChen, W.X., (1999)-characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north –western region of China. Int. J. Syst.Evol. Microbiol. 51, 909-914.

Tan, Z.Y., Wang, E.T., Peng, G.X., Zhu, M. E., Martinez-Romero, E., and Chen, W.X.,(1999) - Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1457-1469.

Terefework, Z (2002)- Diversity and phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of Rhizobium-legume Symbiosis. ACADEMIC DESSIRATION IN MICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN 1239-9469

Terefework, Z., Nick, G .Suomalainen, S., Pauln, L., and Lindström, K., (1998) - Phylogeny of *Rizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. Int. j. Syst.Bact **48** :394-356.

Timmers AC, Auriac MC et Truchet G (1999)-Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium- Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development. **126**: 3617-3628.1617-1629.

Van Brussel AA, Bakhuizen R, Van Sprosen PC, Spaink HP, Tak T et Lugtenberg BJJ (1992) Induction of preinfection thread structures in the leguminous

Van Loon .L.C, (2007), Plant responses to plant growth-promotion rhizobacteria , Eur J Plant Pathol, 119 :243-254. doi :10.1007/s10658-007-9165-1.

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 57: 1192-1199 in Spain Int J Syst Evol Microbiol 57: 784-788.

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

Wang et Martinez-Romero. E(2000), *Sesbania herbacea-Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments , Microb Ecol 40 :25-32.

Wang, Feng Q, WChen, Wen-Ming, de Faria, Sergio M., James, Euan K., Elliott, Geoffrey N., Lin, Kuan-Yin, Chou, Jui-Hsing. (2007) *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* Int J Syst Evol Microbiol, May 2007; 57: 1055 - 1059.

Wais RJ, Keating DH, Long SR (2002) Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiology, **129**, 211-224.

Wasson AP, Pellerone FI et Mathesius U (2006) Silencing the Flavonoid Pathway in *Medicago truncatula* Inhibits Root Nodule Formation and Prevents Auxin Transport Regulation by rhizobia. *Plan Cell*. **18**:1617-1629.

Werner. D., (1992) - symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. *Acad sin*: 39

Zahran H.H (1999) - *Rhizobium* legume symbioses and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Molec. Rev.* **63(4)**: 968-989.

Zakhia F, deLajudie P. (2001) -Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21:569-576.

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* 60: 2552-2556.

Site web n°01:[www.wikipedia.org /Pois chiche](http://www.wikipedia.org/Pois%20chiche).

ملخص

في هذا العمل درسنا إنتاج سلالات الأنزيمية الرانيلة في وجود سلالة مرجعية

Ceceri Mesorhizobium

ويستند الوصف المظهري المطبق في هذا العمل على الخصائص المورفولوجية والثقافية والبحثية من إنزيمات معينة (تحلل اليوريا، والنشاط السليلوزي، والحد من النترات، والبحث عن الليباز).

وتبين هذه الدراسة أن جميع السلالات لها نفس الصفات المظهرية للريزوبيوم

الكلمات الرئيسية :

الرانيلة سيسري الميزورزوبيوم البقول 'البازلاء' الريزوبيوم، الحمص

Summary

In this work we studied the enzymatic production of *Rahnella* strains in the presence of a reference strain *Mesorhizobium Ceceri*.

Phenotypic characterization applied in this work is based on morphological characters and cropping and research of specific enzymes (Hydrolysis of urea, cellulose activity, nitrate reduction, search lipase). This study shows that all strains have the same phenotypic characters that *Rhizobium*.

Nodulation test is performed by highlighting the ability of isolates to nodulate the roots of the host plant showed two weeks after the death of plants so it happens more to prove efficence strains *Rahnella* (terms not bacteriologically controlled).

Keywords: *Rahnella*, *Mezorhizobium ceceri*, *Cicer arietinum*, *Rhizobium*, Legume, Pea.

Résumé

Dans ce travail on a étudié la production enzymatique des souches *Rahnella* en présence d'une souche de référence *Mesorhizobium ceceri*

La caractérisation phénotypique appliquée dans ce travail est basée sur des caractères morphologiques et culturaux et la recherche d'enzymes spécifiques (Hydrolyse de l'urée, Activité cellulosique, Réduction des nitrates, Recherche de lipase). Cette étude montre que toutes les souches ont les mêmes caractères phénotypiques que les *Rhizobium*

Un test de nodulation est effectué en mettant en évidence l'aptitude des isolats à noduler les racines de la plante hôte qui a montré après deux semaines la mort des plantes donc on arrive plus à prouver l'efficence des souches de *Rahnella* (conditions bactériologiquement non contrôlées)

Mots clés : *Rahnella*, *Mesorhizobium ceceri*, *Cicer arietinum*, *Rhizobium*, Légumineuse, Pois chiche.