

BOUZABATA Sara

DJAMAA Fouzia

Thème : Influence des Métaux lourds sur la croissance des souches bactériennes isolées à partir des nodules de *Vicia faba* et *Pisum sativum*

Nature du diplôme : Master en Ecologie microbienne

Résumé : Cette étude consiste à mettre en évidence l'effet des métaux lourds sur les bactéries nodulant les légumineuses isolées à partir des nodules de *Pisum sativum* (le pois) et *Vicia faba* (la fève).

L'étude phénotypique des souches porte sur les caractères morphologiques et culturaux, la recherche d'enzymes spécifiques, la résistance intrinsèque aux métaux lourds aux concentrations choisies ainsi que la mesure de croissance en milieu liquide en présence de différentes concentrations des métaux lourds.

Les résultats obtenus font ressortir la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis des métaux lourds.

Mots clés : *Pisum sativum*, *Vicia faba*, Métaux lourds.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'écologie microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie. Université des Frères Mentouri Constantine

Directeur de Recherche : Mr. A. BENGUEDOUAR Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine.

Membres du jury :

Président : Mr. M.A. HAMIDECHI Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine.

Examineurs : Mme. R. ALATOU Maître de conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine.



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

قسنطينة  
كلية الطبيعة الحياة

**Département : Microbiologie**

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

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : *Ecologie Microbienne***

## Thème

Influence des Métaux lourds sur la croissance des souches bactériennes isolées à partir des nodules de *Vicia faba* et *Pisum sativum*

Présenté et soutenu par : BOUZABATA Sara  
DJAMAA Fouzia

Le : 15/06/2015

### Membres de jury :

<b>Président du jury :</b>	M.A. Hamidechi	Prof. Univ. Frères Mentouri- Constantine.
<b>Rapporteur :</b>	A. Benguedouar	Prof. Univ. Frères Mentouri- Constantine.
<b>Examineur :</b>	R. Alatou	M .C. Univ. Frères Mentouri- Constantine.

*Année Universitaire*  
*2014 - 2015*

## REMERCIEMENTS

*Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements à DIEU tout puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté de finir ce mémoire.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute notre profonde gratitude et nos remerciements à Monsieur **BENGUEDOUAR Ammar**, Professeur au Département de Microbiologie, Université Frères Mentouri- Constantine pour avoir accepté la responsabilité de diriger ce travail, pour ses conseils avisés et pour ses encouragements, ainsi sa patience.*

*Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos profonds remerciements aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.*

*En particulier*

*à Monsieur Le Professeur **HAMIDECHI. Mohamed Abdelhafid**. pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*et à Madame. **ALATOU Radia** pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours pédagogique, que ce soit en Licence ou en Master.*

## *Dédicace*

*A mes très chers parents pour toutes les privations et  
sacrifices.*

*A mes chères sœurs Hassina, Saliha, et Yasmina.*

*A mes chères frères Lyes, Allawa, Ammar, Brahim,  
et Ismail.*

*A mon mari Sid Ali pour ses encouragements.*

*A mes chères amies Ibtissam, Asmaa et Ahlam, pour  
tous les moments que nous avons partagés.*

*A ma collègue FOUZIA qui ma accompagnée tout le long  
de la réalisation de ce travail.*

***SARA***



## *Dédicace*

*Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :*

*A mes très chers parents pour toutes les privations et sacrifices consentis, pour faire de moi une femme modèle.*

*A ma sœur, mes frères et bien sûr mon fiancé pour toute sa patience.*

*A ma collègue Sara qui ma accompagnée tout le long de la réalisation de ce travail.*

*A tout mes cousines et cousins spécialement Meriem et Radouan et à tous mes amis.*

***FOUZIA***

## Résumé

Cette étude consiste à mettre en évidence l'effet des métaux lourds sur les bactéries nodulant les légumineuses isolées à partir des nodules de *Pisum sativum* (le pois) et *Vicia faba* (la fève).

L'étude phénotypique des souches porte sur les caractères morphologiques et culturaux, la recherche d'enzymes spécifiques, la résistance intrinsèque aux métaux lourds aux concentrations choisies ainsi que la mesure de croissance en milieu liquide en présence de différentes concentrations des métaux lourds.

Les résultats obtenus font ressortir la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis des métaux lourds.

**Mots clés :** *Pisum sativum*, *Vicia faba*, Métaux lourds.

## **ABSTRACT**

This study is to highlight the effect of heavy metals on nodulating bacteria isolated from nodules legume *Pisum sativum* (peas) and *Vicia faba* (broad bean).

The phenotypic study of stem covers the morphological and cultural characters, looking for specific enzymes, intrinsic resistance to heavy metals and the chosen concentrations in liquid medium growth measurement in the presence of different concentrations of heavy metals.

The results highlight the strength and sensitivity vis-à-vis the heavy metal stem.

**Keywords:** *Pisum sativum*, *Vicia faba*, Heavy metals.



هذه هو تسليط ( *Pisum sativum* )  
تأثير ( *Vicia faba* )  
الثقيلة البكتيريا الجذرية المعزولة العقد الجذرية للبرلاء

المظهرية الثقيلة وتركيزات  
قياس وحساسية  
المورفولوجية والثقافية،  
تركيزات الثقيلة  
إنزيمات معينة،  
الثقيلة الذاتية

*Pisum sativum, Vicia faba* :  
الثقيلة.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les différentes stratégies de phytoremédiation utilisées pour dépolluer les environnements contaminés en métaux lourds (Maynaud, 2012).....	5
<b>Figure 2</b> : Dialogue moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse hôte et le genre <i>Rhizobium</i> (Maynaud, 2012).....	11
<b>Figure 3</b> : Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de <i>Rhizobium</i> (Cullimore et <i>al.</i> , 2001).....	12
<b>Figure 4</b> : Phylogénie de quelques légumineuses (Udvardi et <i>al.</i> , 2005).....	14
<b>Figure 5</b> Conservation des nodules sous CaCl <sub>2</sub> (Vincent, 1970).....	24
<b>Figure 6</b> : Croissance des souches sur Milieu TY en présence de ZnSO <sub>2</sub> .....	31
<b>Figure 7</b> : Croissance des souches sur Milieu TY en présence de ZnSO <sub>4</sub> .....	32
<b>Figure 8</b> : Croissance des souches sur Milieu TY en présence de ZnSO <sub>4</sub> .....	32
<b>Figure 9</b> : Croissance des souches sur Milieu TY en présence de ZnSO <sub>4</sub> .....	33
<b>Figure 10</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de CuSO <sub>4</sub> .....	33
<b>Figure 11</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de CuSO <sub>4</sub> .....	34
<b>Figure 12</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de CuSO <sub>4</sub> .....	34
<b>Figure 13</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de CuSO <sub>4</sub> .....	35
<b>Figure 14</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de Pb(COO) <sub>2</sub> .....	35
<b>Figure 15</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de Pb(COO) <sub>2</sub> .....	36
<b>Figure 16</b> : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de Pb(COO) <sub>2</sub> .....	36

<b>Figure 17 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence de $Pb(COO)_2$ .....	37
<b>Figure 18 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence de $HgCl_2$ .....	37
<b>Figure 19 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence de $HgCl_2$ .....	38
<b>Figure 20 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence de $HgCl_2$ .....	38
<b>Figure 21 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence de $HgCl_2$ .....	39
<b>Figure 22 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence $CdCl_2$ .....	39
<b>Figure 23 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence $CdCl_2$ .....	40
<b>Figure 24 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence $CdCl_2$ .....	40
<b>Figure 25 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en présence $CdCl_2$ .....	41
<b>Figure 26 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds.....	41
<b>Figure 27 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds.....	42
<b>Figure 28 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds.....	42
<b>Figure 29 :</b> Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds.....	43

## Liste des photos

<b>Photographie 1</b> : Le pois ( <i>Pisum sativum</i> ) (gepotany.newneglandwild.org).....	15
<b>Photographie 2</b> : La féve ( <i>Vicia faba</i> ) ( <a href="http://www.agroatlas.ru">www.agroatlas.ru</a> ).....	16
<b>Photographie 3</b> : <i>Pisum sativum</i> .....	23
<b>Photographie 4</b> : <i>Vicia faba</i> .....	23
<b>Photographie 5</b> : Aspect des colonies de VF2 sur le milieu YMA.....	29
<b>Photographie 6</b> : Aspect des colonies de VF2 sur le milieu YMA+rouge Congo.....	30
<b>Photographie 7</b> : Observation microscopique des bactéries x 100.....	30
<b>Photographie 8</b> : Croissance de VF3 sur YMA+BTB.....	31
<b>Photographie 9</b> : Recherche du nitrate réductase.....	32
<b>Photographie 10</b> : Activité cellulosique chez P.....	32
<b>Photographie 11</b> : Hydrolyse de l'urée chez VF 1.....	33
<b>Photographie 12</b> : Croissance des isolats en présence de ZnSO <sub>4</sub> .....	34
<b>Photographie 13</b> : Croissance des isolats en présence de Pb(COO) <sub>2</sub> .....	34
<b>Photographie 14</b> : Croissance des isolats en présence de CuSO <sub>4</sub> .....	35
<b>Photographie 15</b> : Croissance des isolats en présence de CdCl <sub>2</sub> .....	35

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : les souches utilisées dans cette étude.....	26
<b>Tableau 2</b> : les concentrations des métaux lourds utilisés.....	28
<b>Tableau 3</b> : Concentrations des Métaux lourds utilisés.....	28
<b>Tableau 5</b> : Production d'enzymes spécifiques par les isolats et souches de référence.....	34
<b>Tableau 6</b> : Détermination de la CMI des métaux lourds.....	36

## Sommaire

Introduction .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
1. Impact des métaux lourds sur l'environnement .....	2
1.1. Définition des métaux lourds .....	2
1.2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds .....	2
1.3. Effet des métaux lourds sur l'environnement.....	3
1.3. 1. La phytoextraction.....	4
1.3.2. La Phytostabilisation .....	4
1.4. Toxicité des métaux lourds .....	5
1.4.1. Effet toxique des métaux lourds.....	6
2. L'effet des métaux lourds sur la symbiose.....	10
2.1. La symbiose fixatrice d'azote .....	10
2.1.1. Les flavonoïdes .....	11
2.1.2. Les facteurs Nod.....	11
2.2. Effet des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia.....	12
3. Les deux partenaires du la symbiose fixatrice d'azote.....	13
3.1 Le macrosymbiont : la plante. ....	13
3.1.1. Les légumineuses .....	13
3.1.2. Le macrosymbiont spécifique .....	15

3. 2. Le microsymbiant : la bactérie .....	17
3.2.1. Biologie de <i>Rhizobium</i> .....	17
3.2.2. Description de genre <i>Rhizobium</i> .....	18
3. 2.3. Le microsymbiont spécifique .....	19
3. 3. Effet des métaux lourds sur les rhizobia .....	20

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

1. Isolement des bactéries à partir des nodules .....	23
1 .1. La collecte des nodules .....	24
1.2. Conservation des nodules .....	24
1.3. Isolement des souches à partir des nodules .....	24
1.3.1. Stérilisation de nodules.....	24
1.3.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés .....	25
1.4. Caractères morphologique et culturaux des isolats .....	25
1 .4 .1. Vitesse de croissance .....	25
1 .5. Conservation des souches.....	26
1.6. Recherche d'enzymes spécifiques .....	26
1.6. 1. Réduction des nitrates (nitrate-réductase) .....	26
1.6.2. Hydrolyse de l'urée (uréase) .....	27
1.6.3. Activité cellulolytique .....	27
2. Résistance intrinsèque aux métaux lourds.....	27
3. Mesure de la croissance en milieu liquide des souches en présence des métaux lourds.....	28

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Caractérisations morphologiques et culturaux des isolats.....	29
1.1. Croissance des isolats sur milieu YMA .....	29
1.2. Croissance sur YMA+ rouge Congo .....	29
1.3. Observation microscopique.....	30
1.4. Croissance sur milieu YMA au Bleu de Bromothymol .....	31
2. Recherche des enzymes spécifiques.....	31
2.1. Réduction de nitrate .....	31
2.2. Activité cellulolytique .....	32
2.3. Hydrolyse de l'urée .....	33
3. Résistance intrinsèque aux métaux lourds .....	34
4. Mesure de la croissance des souches en présence des métaux lourds.....	37
5. Discussion .....	50
Référence bibliographique.....	52
Annexe.....	59



## Introduction

Les métaux sont placés dans la catégorie des polluants de l'environnement en raison de leurs effets toxiques chez les plantes, les microorganismes et l'homme. Ils sont classés en deux grands groupes selon leur importance sur la santé : les métaux essentiels et les métaux non essentiels. L'Homme, par une forte industrialisation et une agriculture intensive utilisatrice d'engrais et de pesticides, contribue à la dissémination des éléments traces métalliques et à leur accumulation dans les sols.

Les fortes teneurs en éléments traces métalliques (ETMs) présentes dans les déblais miniers sont potentiellement toxiques et provoquent généralement une très forte réduction de la diversité végétale et microbienne. Cependant, certaines espèces végétales et microorganismes, selon les caractéristiques physico-chimiques des sols, la nature des métaux, leur concentration et leur spéciation ont développé des mécanismes particuliers et se sont adaptées à la présence des ETMs.

La présence de métaux lourds dans le sol, à concentrations élevées, affecte souvent les populations microbiennes d'une manière générale, et les bactéries associées aux plantes, en particulier. Le Cd, par exemple, à faible dose, affecte la symbiose *Rhizobium-Trifolium partense* (Maynaud, 2012). Le Zn, par contre, même à fortes concentrations, n'affecte que la survie et le nombre de rhizobia.

A partir des données bibliographiques nous avons mesuré la croissance en milieu liquide des bactéries nodulant les espèces de légumineuses *Vicia faba* et *Pisum sativum*. Cette croissance est précédée d'une caractérisation des souches isolées par un examen microscopique, morphologique et biochimique.

Dans notre manipulation nous avons procédé :

- Isolement des souches à partir des nodules racinaires.
- Etude morphologique sur milieux spécifiques.
- Recherche des enzymes spécifiques.
- La résistance intrinsèque aux métaux lourds et la mesure de croissance en milieu liquide en présence des métaux non toxiques (Cu et Zn) et toxiques (Cd, Pb et Hg).

# CHAPITRE UN

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUES

## 1. Impact des métaux lourds sur l'environnement

### 1.1. Définition des métaux lourds

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à  $5 \text{ g.cm}^3$  (Adriano, 2001).

D'un point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques.

- Les **métaux essentiels** sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du milli-molaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Adriano, 2001).
- Les **métaux toxiques** ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd).

Le terme métaux lourds, « heavy metal », implique aussi une notion de toxicité. Le terme « éléments traces métalliques » est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (Baker et Walker, 1989).

### 1.2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols. Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique.

- **Origine naturelle**

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Bourrelier et Berthelin, 1998). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge.

- **Origine anthropique**

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique. Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle.

- La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles (rejets d'usine) et urbaines (gaz d'échappement, etc....) (Baize, 1997).
- Certaines pratiques agricoles sont à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même par exemple les engrais, les composts et les boues de station d'épuration (Robert et Juste, 1999).
- La pollution industrielle provenant des usines de production de l'activité humaine tels que les matières organiques et graisses (industries agro-alimentaires), les produits chimiques divers (industries chimiques), les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et la métallurgie (Godin et *al.*, 1985). Les déchets miniers et les terrils industriels sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium.

### **1.3. Effet des métaux lourds sur l'environnement**

Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds générés par les activités anthropiques ne peuvent pas être dégradés biologiquement et persistent indéfiniment dans l'environnement. De plus, les environnements pollués tels que les sites miniers sont généralement soumis à de fortes contraintes topographiques, climatiques et hydriques, érodant fortement les déchets et induisant une pollution pour les eaux et les sols environnants. Les sols miniers sont pauvres en matière organique et en minéraux fertilisants comme l'azote empêchant alors le développement d'une couverture végétale pouvant faire office de barrière

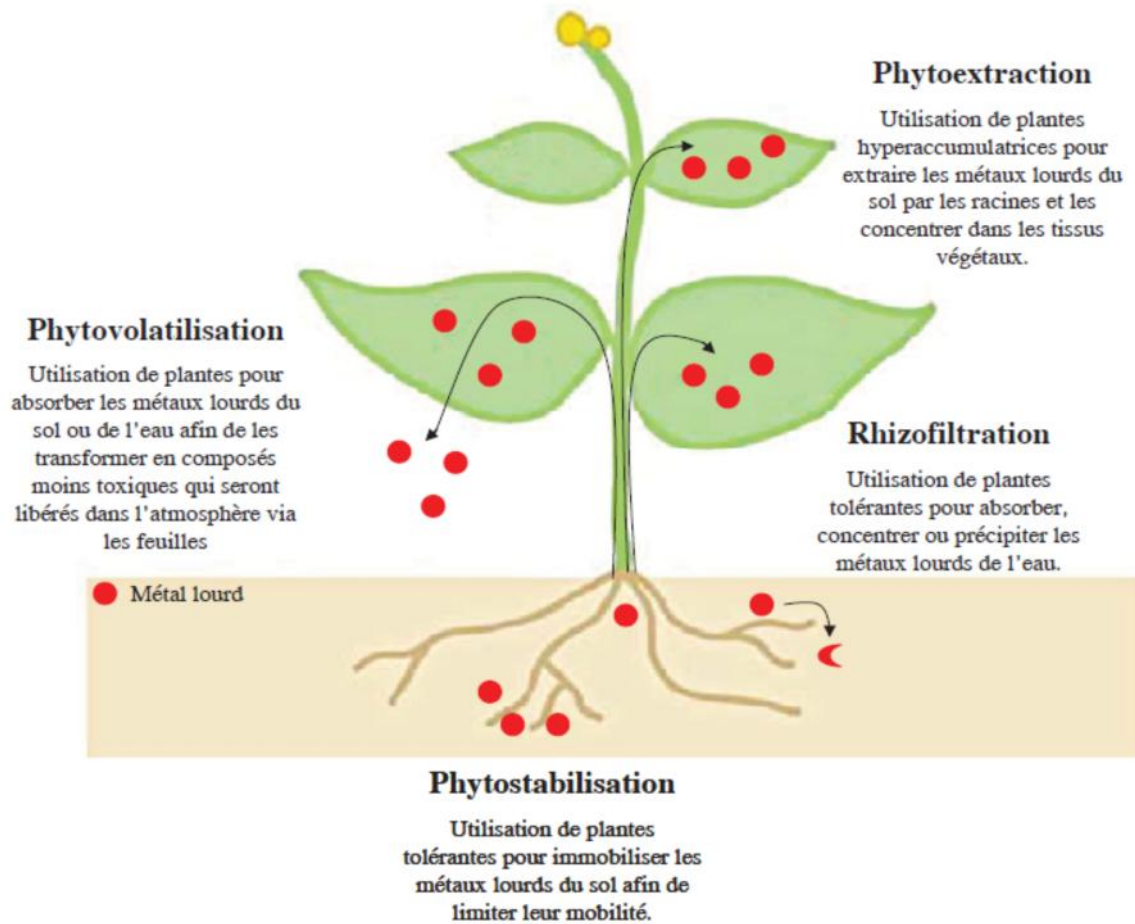
à la dispersion des métaux lourds. De ce fait, la non-gestion des sites miniers pose un problème environnemental conduisant à de graves dégâts écologiques (Maynaud, 2012).

### 1.3. 1. La phytoextraction

Est une technique qui utilise des plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds: ce sont des plantes capables d'accumuler 10 000 mg kg<sup>-1</sup> de poids sec pour le Zn, 1 000 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cu, Pb, 100 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cd, 1 000 mg kg<sup>-1</sup> pour le Ni, afin de concentrer les contaminants du sol dans les tissus végétaux. La récolte des plantes permet une récupération des métaux lourds à intérêt économique. Cependant, son utilisation est restreinte à des sols modérément contaminés et son extraction est limitée à la surface du sol (profondeur des racines) et à la fraction disponible par les végétaux. Elles sont adaptées à des environnements particuliers et sont peu compétitives par rapport aux autres plantes, dès que la concentration en métaux lourds est en dessous d'un certain seuil. Il y a aujourd'hui environ une centaine de taxons identifiés comme capables d'accumuler des métaux lourds appartenant au moins à 100 familles de plantes. Parmi ces plantes, l'une des plus connues est *Thlaspi caerulescens*, largement étudiée par la communauté scientifique car elle est capable d'accumuler de fortes quantités en Zn et en Cd dans les parties aériennes sans symptômes de toxicité de Zn (Maynaud, 2012).

### 1.3.2. La Phytostabilisation

Est une technique qui utilise des plantes tolérantes aux métaux lourds en association avec des microorganismes pour limiter la diffusion des particules métalliques par voies aériennes ou hydriques. Les plantes utilisées accumulent très peu de métaux lourds dans les parties aériennes afin de limiter le transfert dans la chaîne alimentaire. Le principal désavantage de cette technique est que les métaux lourds restent dans le sol, ils ne sont pas enlevés. En effet, cette technique n'a pas pour but d'enlever les métaux lourds dans le sol mais seulement de les contenir. Cette technique est par contre efficace pour des sites très contaminés tels que les sites miniers où la méthode de phytoextraction est peu efficace. Les travaux de Frérot et *al.* (2006) sur la phytostabilisation d'anciens déblais miniers riches en Zn, Cd et Pb dans la région méditerranéenne ont montré *in situ* que la combinaison d'écotypes métallophiles de plantes natives de la région permettait d'améliorer et de régénérer de façon durable et significative la fertilité du sol en l'enrichissant en minéraux fertilisants et plus particulièrement en azote (Maynaud, 2012).



**Figure 1** : Les différentes stratégies de phytoremédiation utilisées pour dépolluer les environnements contaminés en métaux lourds (Maynaud, 2012).

#### 1.4. Toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds ont tous un potentiel toxique qui dépend principalement de leur concentration dans le milieu considéré et de leur biodisponibilité, c'est-à-dire de leur fraction soluble et accessible par les organismes.

La biodisponibilité en métaux lourds définit leur aptitude à être transférés d'un compartiment vers un autre. Plus l'espèce métallique est libre et mobile, plus elle est biodisponible et plus il y a un risque de toxicité sur les organismes vivants. La biodisponibilité dépend de la spéciation du métal (différentes formes chimiques d'un élément métallique) ainsi que des conditions physico-chimiques de l'environnement où se trouve le métal considéré (pH, teneur en phosphate disponible, teneur en matière organique, activités

biologiques). En effet, les métaux lourds existent soit sous forme élémentaire soit sous forme dérivée. Etant chargés positivement, ils sont alors susceptibles d'interagir avec n'importe quels éléments chargés négativement pour former des dérivés inorganiques (sel, sulfure, oxyde) ou organiques (avec liaison carbone) (Maynaud, 2012). L'acidification du sol favorise la mobilité des métaux lourds notamment par la mise en solution de sels métalliques. Inversement, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation par la formation de composés insolubles. La plupart des plantes excrètent par leur racine des acides afin de favoriser l'absorption d'éléments nutritifs et du coup solubilisent aussi d'autres éléments pas forcément nécessaires à la plante. Ainsi, l'acidification de la rhizosphère de *Thlaspi caerulescens* faciliterait la capture par la plante des métaux lourds devenus plus disponibles suite à la baisse du pH. A l'inverse, des sols carbonatés, argileux ou riches en matière organique globalement chargés négativement ont tendance à retenir les cations métalliques et donc les rendre moins disponibles. Les activités biologiques de certains organismes peuvent aussi influencer la disponibilité des métaux lourds présents dans le sol. Certaines activités métaboliques microbiennes influencent aussi la mobilité des métaux lourds par solubilisation, insolubilisation ou volatilisation (Maynaud, 2012). Le Cd est très rare sous sa forme naturelle, il peut être retrouvé sous forme de sulfure de Cd (CdS) ou de carbonate (CdCO<sub>3</sub>) et plus souvent associé au Zn, Cu et Pb sous forme de sulfure. Le Cd est beaucoup plus mobile que le Zn et particulièrement autour de pH 4,5-5,5 et il ne l'est plus au dessus de pH 7,5. Sa forme divalente est soluble mais peut se complexer avec des formes organiques et oxydées. Le Zn est sous forme divalente et peu mobile à des pH acides (4.5-5.5) alors qu'à des pH plus forts (6.5-7.5), le Zn est plus disponible grâce à la solubilisation de ses formes minérales et organiques (Maynaud, 2012).

#### **1.4.1. Effet toxique des métaux lourds**

- **Sur les plantes**

Les symptômes de toxicité associés aux métaux lourds sont peu différents de ceux produits par différents types de stress.

Ils peuvent être classés en deux catégories : les symptômes visibles et les symptômes uniquement mesurables ; leur importance étant fonction de la mobilité du métal à l'interface sol-plante et à l'intérieur de la plante, mobilité qui détermine la concentration endogène du métal (Michel, 2009).

Le premier effet des métaux lourds introduits dans la rhizosphère va se traduire par une interaction avec les autres composants ioniques du sol. Les métaux peuvent alors précipiter avec des ligands anioniques ou entrer en compétition avec d'autres cations pour des sites de liaison de la paroi pecto-cellulosique des cellules racinaires. Dû au fait que la paroi présente une considérable capacité d'échange des cations, le premier effet des métaux lourds sera l'inhibition ou la stimulation de l'absorption des cations, causant des changements significatifs du métabolisme (par exemple un stress dû à la déficience en fer) (Michel, 2009).

L'effet le plus habituel et le moins spécifique des métaux lourds consiste en une réduction de la croissance des différentes parties de la plante. Selon l'importance du stress, les feuilles peuvent présenter une chlorose due à la fois à une perte de chlorophylle, à une relative augmentation des caroténoïdes et à une déficience en fer (Michel, 2009). Dans les cas les plus sévères, une apparition de tâches nécrotiques est observée (Michel, 2009).

Ces effets apparents résultent en fait d'une altération de processus vitaux tels que le transport et le métabolisme. Ainsi, une diminution de la conductivité hydraulique racinaire associée à la fermeture des stomates entraîne une réduction de la transpiration (Michel, 2009).

Les métaux induisent également un abaissement de la photosynthèse qui résulte soit d'un effet direct sur le transport des électrons et les enzymes du cycle de Calvin (en particulier de la Rubisco) soit d'un effet indirect, en raison d'une diminution de la teneur en chlorophylle (Michel, 2009).

Afin de prévenir ou de contrer les effets toxiques des métaux, la plante met en place des stratégies de défense plutôt efficaces. Ces mécanismes cellulaires menant à la détoxification ou à la tolérance des métaux chez les plantes comprennent: (Pier-Anne, 2009)

- la restriction du mouvement des métaux par les mycorhizes ;
- Attachement des métaux à la membrane cellulaire ou aux exsudats racinaire ;
- la réduction de l'influx au niveau de la membrane plasmique l'efflux actif provenant de l'apoplaste ;
- la présence d'agents chélateurs dans le cytosol ;
- la réparation active de la membrane plasmique en conditions de stress ;
- le transport de complexes métalliques (ex: phytochélatines) vers les vacuoles



- le transport et l'accumulation des métaux dans les vacuoles. Les plantes possèdent donc plusieurs stratégies pour s'adapter à la présence de métaux dans leur environnement.

- **Sur les microorganismes**

Les concepts de tolérance, résistance et sensibilité aux métaux peuvent être facilement confondus les uns avec les autres ou utilisés un peu à toutes les sauces. De plus, les définitions précises des termes tolérance et résistance portent parfois à confusion dans la littérature. Une publication de Gadd (1992) propose une terminologie plus précise et spécifique. Le terme «tolérance » devrait être employé lorsque les organismes supportent la présence des métaux grâce à leurs caractéristiques biologiques intrinsèques, alors que le mot « résistance » devrait être mentionné lorsque les organismes survivent à la présence de métaux à l'aide de mécanismes de détoxification spécifiques induits en présence du contaminant (Pier-Anne, 2009).

De manière globale, les métaux exercent une pression sélective augmentant la tolérance de base de certains microorganismes, mais diminuent la biodiversité des microorganismes retrouvés dans ces sols en comparaison avec des sols non pollués (Pier-Anne, 2009).

La sensibilité des microorganismes peut se traduire par une diminution de l'expression protéique alors qu'une augmentation de l'expression protéique signifierait une tentative d'adaptation au nouveau contaminant (expression d'un mécanisme de résistance) (Pier-Anne, 2009). Chez les bactéries, les gènes codant pour l'expression des protéines impliquées dans ces mécanismes sont principalement plasmidiques, bien que quelques-uns soient chromosomiques (Pier-Anne, 2009). L'origine plasmidique de certains gènes peut résulter en une fréquence de transfert plus élevée de ces plasmides en conditions de stress. Un tel exemple a été démontré chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui, en présence de métaux, transférait ses plasmides lui procurant sa résistance (Pier-Anne, 2009).

- **Mécanismes d'adaptation des bactéries aux métaux lourds**

Certaines bactéries arrivent à résister à de fortes concentrations en métaux lourds. Pour avoir un effet toxique, les ions métalliques doivent d'abord entrer dans la cellule bactérienne. Certains métaux lourds sont nécessaires pour les fonctions enzymatiques et la croissance bactérienne ce qui explique la présence de mécanismes d'absorption qui permettent l'entrée

des ions métalliques dans la cellule. La résistance aux métaux est le résultat du développement de mécanismes de tolérance permettant à la bactérie de détoxifier les métaux présents en trop grandes quantités dans le milieu (Soussou ,2013). Les ions métalliques essentiels entrent dans la cellule grâce à des transporteurs non spécifiques et d'autres spécifiques. Parmi les deux types de systèmes d'absorption, le premier est exprimé de façon constitutive, rapide et généralement piloté par le gradient chimiosmotique à travers la membrane cytoplasmique des bactéries et donc ne nécessite pas de l'ATP. Ce système résulte d'un afflux d'une plus grande variété des métaux lourds, une situation qualifiée de «porte ouverte» qui permet de comprendre pourquoi les ions métalliques sont toxiques (Soussou ,2013). Le deuxième système est spécifique et il est relativement lent et est entraîné par l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Soussou ,2013).

La résistance aux métaux et la survie sont le résultat d'une coopération entre les mécanismes de résistance et le métabolisme métallique cellulaire normal (Soussou ,2013). Il existe plusieurs mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries. Ces mécanismes comprennent :

- ✓ **l'exclusion par perméabilité de la membrane** : les bactéries forment naturellement un « revêtement » de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux (Claire, 2012) ;
- ✓ **l'efflux actif** : il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire (Claire, 2012). Chez *P. aeruginosa*, l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  est exporté par un mécanisme impliquant 4 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme (Claire, 2012) ;
- ✓ **Séquestration intracellulaire des métaux lourds par la production de diverses protéines chélatantes** : les métallothionéines sont des protéines intracellulaires riches en cystéine, elles ont été identifiées comme capable de séquestrer des cations de Zn et de Cd (Maynaud, 2012). Il permet la séquestration des métaux au sein du cytoplasme afin d'éviter l'exposition des composants cellulaires essentiels aux métaux.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sont les métaux les plus fréquemment séquestrés (Claire, 2012). Cette stratégie a été mise en évidence chez *P. putida* pour le  $\text{Cd}^{2+}$  par la synthèse de trois protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines (Claire, 2012) ; Chez *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, la production de glutathion, un tripeptide contenant un groupement thiol qui

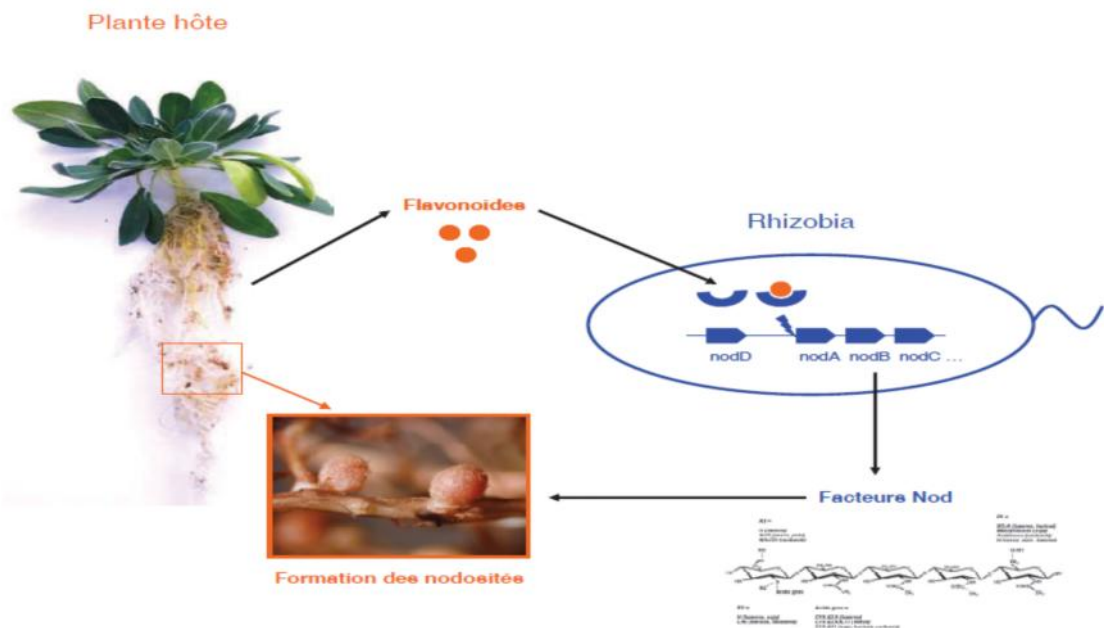
produit en général lors d'un stress oxydatif a été mis en évidence dans la détoxification de cations métalliques tels que le Cd et le Ni (Maynaud, 2012) ;

- ✓ **La détoxification enzymatique** : elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques (Maynaud, 2012) ;
- ✓ **La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux** : cette protection se déroule par mutation, diminuant ainsi la sensibilité sans altérer les fonctions de base de la cellule (Claire, 2012) ;
- ✓ **la production de sidérophores** : en liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité (Claire, 2012). Une souche de *P. aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de sidérophore (Claire, 2012).

## 2. L'effet des métaux lourds sur la symbiose

### 2.1. La symbiose fixatrice d'azote

La symbiose fixatrice d'azote se traduit par la capacité des *Rhizobium* à induire la formation de nodosités au niveau des racines ou même des tiges de légumineuses particulières (processus de nodulation). Lors de cette symbiose un véritable dialogue moléculaire s'installe entre les deux partenaires (Figure 2). Ce dialogue s'effectue grâce à un échange de messages libérés sous forme de signaux biochimiques dont font partie les flavonoïdes excrétés par les racines. Une induction de l'expression des gènes *nod* permet alors aux bactéries de synthétiser des molécules signaux appelées facteurs Nod (lipo-chito-oligosaccharides) responsables de la nodulation (Tereferwork, 2002). Les gènes *nod* sont localisés pour la plupart sur des plasmides de grande taille appelés les *pSym*.



**Figure 2** : Dialogue moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse hôte et le genre *Rhizobium* (Maynaud, 2012)

### 2.1.1. Les flavonoïdes

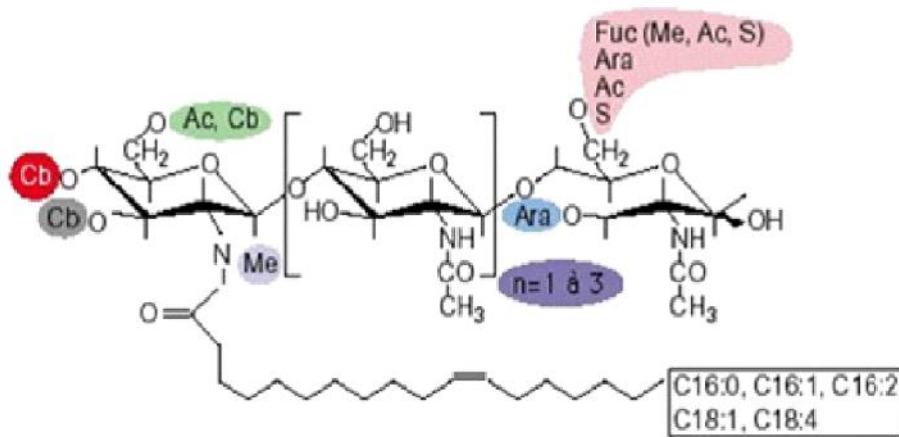
Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol (Taylor et Grotewold, 2005 ; Gibson et *al.*, 2008), induisant l'expression des gènes de nodulation chez les rhizobia (Cooper 2007 ; Zhang et *al.*, 2009). Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes (Cooper, 2004 ; Perret et *al.*, 2000), dont les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses.

### 2.1.2. Les facteurs Nod

Les gènes *nod* produisent des enzymes qui contrôlent la synthèse de molécules indispensables au processus de nodulation. Ces signaux, généralement connus sous le nom de facteurs Nod, sont des molécules lipo-chito-oligosaccharidiques (Terefework, 2002). Ils sont constitués d'un squelette de trois à six résidus N-acétyl-D-glucosamine réunies par des liaisons (1-4) (structure de la chitine), substitué par une chaîne d'acétyl au niveau de l'extrémité non réductrice et portant divers motifs structuraux aux deux extrémités de la chaîne oligosaccharidique (Figure 3).

Les facteurs Nod sont responsables de la spécificité, de la reconnaissance entre les symbiotes, et du déclenchement de la nodulation. En effet, même émis à des concentrations minimales, ces signaux peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debellé et *al.*, 2001).

Les gènes communs *nod ABC* déterminent la synthèse de la structure de base commune à tous les facteurs Nod (Denarie et *al.*, 1996). La protéine NodC catalyse la synthèse du chito-oligomère et en contrôle la longueur. L'unité de glucosamine à l'extrémité non réductrice est désacétylée par *nodB*, et substituée par une chaîne d'acide gras par *nodA*. Les gènes *nod* spécifiques modifient le squelette oligochitinique à l'aide de substitutions particulières et confèrent aux facteurs Nod leurs spécificités.



**Figure 3 :** Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de *Rhizobium*. Ac : acetyl, Ara, arabinosyl; Cb, carbonyl; Fuc, fucosyl; Me, méthyl; S, sulfuryl (Cullimore et *al.*, 2001).

## 2.2. Effet des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia

Divers facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse, l'acidité, l'alcalinité, les métaux lourds et les hydrocarbures, les températures extrêmes, des déficits en nutriments ont des effets néfastes à tous les stades menant à l'établissement de la symbiose ; depuis l'infection à la fixation de l'azote en passant par la formation des nodosités et la croissance des rhizobia et de la plante (Maynaud, 2012).

Le Cd par exemple est l'un des métaux lourds qui même à de faible dose est très toxique pour les organismes vivants. Son effet sur la symbiose et sur le développement des deux partenaires est bien documenté (Maynaud, 2012). Au sein de la population de *Rhizobium* isolée des nodosités de *Trifolium pratense* L. le Cd affecte la diversité, la croissance et l'activité microbienne ce qui est directement corrélé avec la diminution du nombre de nodosités présentes sur les racines ((Maynaud, 2012). Au sein des légumineuses, diverses publications font état des effets néfastes du Cd sur la croissance, la photosynthèse, la nutrition, la fixation d'azote chez le haricot et le soja (Maynaud, 2012). Chez le soja, le Cd induit la sénescence des nodosités, réduit le nombre de nodosités et indirectement, induit aussi un stress oxydatif qui réduit la synthèse de protéines (leghémoglobine) et de carbohydrates dans la nodosité (Maynaud, 2012).

Bien que le Zn soit un oligoélément indispensable à la vie, à de trop fortes concentrations il affecte significativement la survie et le nombre de rhizobia (Brooset *al.*, 2005). Dans le cas de la symbiose *Rhizobium/Acacia auriculaeformis*, la formation des nodosités est inhibée de 50 % par de fortes teneurs en Zn et la fixation d'azote diminue avec l'augmentation de la concentration en Zn (Maynaud, 2012).

### 3. Les deux partenaires de la symbiose fixatrice d'azote

#### 3.1. Le macrosymbiont : la plante

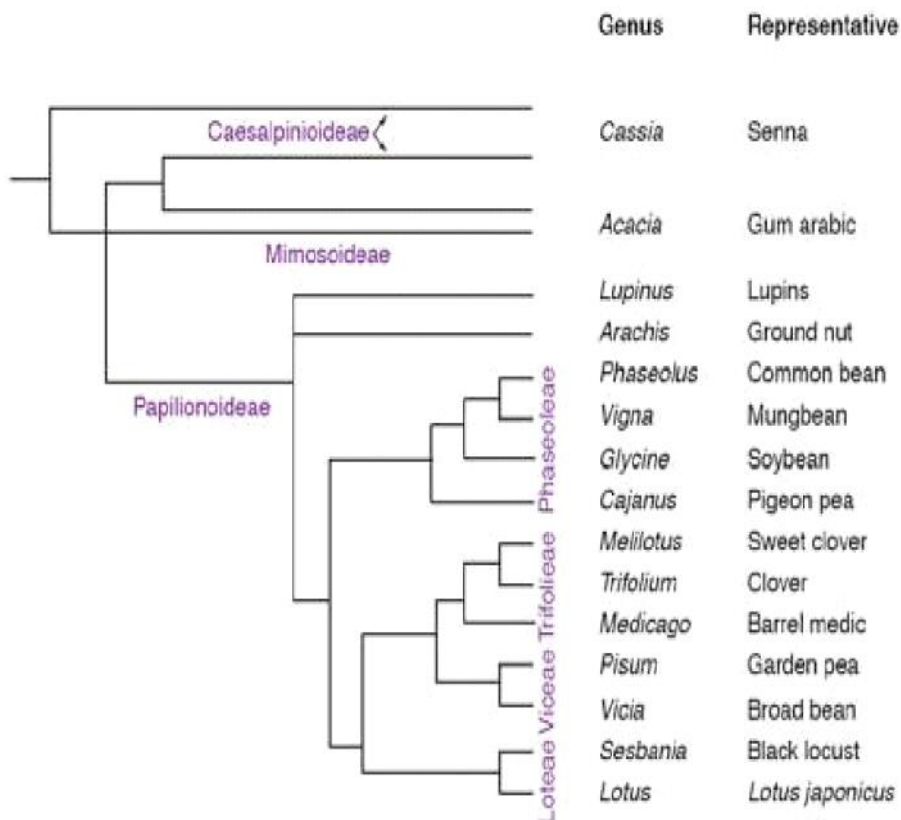
##### 3.1.1. Les légumineuses

Les légumineuses représentent la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), de l'ordre des *Fabales*, la sous classe des *Rosidae*, et la classe des *Dicotyledonae*. Elles forment une famille importante et variée des Angiospermes, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Doyle et Luckow, 2003). La famille des légumineuses (fabacées) comprend plus de 700 genres et près de 20 000 espèces (Lewis et *al.*, 2005) répartis en trois sous-familles : les *Caesalpinoideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003).

Les *Papilionoideae* représentent la sous -famille la plus diversifiée et compte près de 14000 espèces réparties en 476 genres de légumineuses tropicales et tempérées. Les plantes sont principalement des herbacées mais comprennent aussi des arbres et des arbustes, Parmi les espèces étudiées (21% du total), 97% sont nodulées par les rhizobiums (Doyle et Luckow,

2003). Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de «papillon » (Guignard et Dupont, 2005). Les *Papilionoideae* ont une grande importance au niveau de l'agriculture. Elles sont cultivées pour leurs graines riches en protéines ou pour leurs propriétés fourragères, on peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sp*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), la lentille (*Lens esculenta*).

Les *Mimosoideae* sont composés surtout d'arbres et d'arbustes présents dans les régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille renferme 77 genres et 3000 espèces ; parmi les espèces ayant été étudiées sur leur caractère symbiotique (10% environ), 90 % ont été trouvées nodulées (Doyle et Luckow, 2003). Enfin, les *Caesalpinioideae* comprennent 162 genres et environ 3000 espèces, majoritairement des arbres ou des arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales (Doyle et Luckow, 2003), dont seules 23% des espèces étudiées sont nodulées par les rhizobiums.



**Figure 4 :** Phylogénie de quelques légumineuses (Udvardi et al., 2005).



### 3.1.2. Le macrosymbiont spécifique

- **Le pois**

Le pois est une plante herbacée annuelle qui appartient à la sous-famille des *Papilionoideae*. Possédant 7 paires de chromosomes ( $2n=14$ ), autogame, grimpante, atteignant 2 à 3m de haut, avec une racine pivotante bien développée, atteignant 1.2m de long, à nombreuses racines latérales ; une tige cylindrique, non ou peu ramifiée à la base ; et des feuilles composées dont les folioles supérieures sont transformées en vrilles, encadrées à leur base par des stipules (Brink et Belay, 2006 ; Messiaen et Messiaen- Parotto, 2009).



**Photographie 1** : Le pois (*Pisum sativum*) (gepotany.newneglandwild.org)

- **Classification**

L'espèce *Pisum sativum* appartient au genre *Pisum*, classé dans la tribu des *Fabeae* (ou *Viciae*), qui regroupe diverses espèces de plantes herbacées annuelles, réparties en cinq genres : *Lathyrus* L. (gesse/pois doux, environ 160 espèces), *Lens* (lentilles, 4 espèces), *Pisum* L. (pois, 3 espèces), et *Vicia* L. (vesces ; environ 140 espèces) et le genre monotypique *Vavilovia* (Smýkal et al., 2011). La classification la plus récente du genre *Pisum*, après avoir compté plusieurs espèces, ne regroupe plus que trois espèces (Smýkal et al., 2011 ; Cieslarová et al., 2011) :

- *P. sativum* L.
  - Subsp. *sativum* (comprend var. *sativum* et var. *arvense*)
  - Subsp. *elatius*



- *P. fulvum*
- *P. abyssinicum*

- **La fève**

La fève est une plante herbacée annuelle qui appartient à la sous-famille des *Papilionoideae*. Possédant 6 paires de chromosomes ( $2n=13$ ), robuste, grimpante, qui peut atteindre plus d'un mètre. Ses feuilles, composées de 2 à 7 folioles, sont alternes sur la tige de section carrée. Ses fleurs, disposées en racème (grappe), sont blanches avec un point noir sur les ailes, zygomorphes (à symétrie axiale) et hermaphrodites, à pollinisation entomophile (Evans 1959).



**Photographie 2** : La fève (*Vicia faba*) ([www.agroatlas.ru](http://www.agroatlas.ru))

- **Classification**

Décrite par Linné en 1753, la fève *Vicia faba* L. (broadbean en anglais) est une plante dicotylédone herbacée originaire d'Asie ou du Moyen-Orient. Sa culture est très ancienne et pratiquée dans le monde entier.

Sa classification systématique est la suivante :

- Règne *Plantae*
- Sous-règne *Tracheobionta*
- Division *Magnoliophyta*

- Classe *Magnoliopsida*
- Sous-classe *Rosidae*
- Ordre des *Fabales*
- Famille des *Fabaceae*
- Genre *Vicia*
- Espèce *faba*

Il en existe 2 sous-espèces, *paucijuga* et *eu-faba*. Dans la sous-espèce *eu-faba* qui nous intéresse, on dénombre 3 variétés différentes (Gallais and Bannerot 1992) :

- *Vicia faba major*, la fève maraîchère à grosses graines destinées à la consommation humaine ;
- *Vicia faba minor*, la petite fève ou féverole utilisée pour l'alimentation du bétail ;
- *Vicia faba equina*, la fève à cheval à grains moyens aussi appelée féverole ou févette dans certaines régions. Comme son nom l'indique elle est également destinée à l'alimentation du bétail.

### **3. 2. Le microsymbiont : la bactérie**

#### **3.2.1. Biologie de *Rhizobium***

*Rhizobium* forme un groupe de bactérie du sol aérobies appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* et le terme de rhizobia, Ces bactéries présentent la capacité de rentrer en symbiose avec des plantes en formant des nodosités, qu'on retrouve spécifiquement chez les légumineuses telles que : pois (*Pisum sp*), haricot (*Phaseolus sp.*), soja (*Glycine sp*), arachide (*Arachis hypogaea*), trèfle (*Trifolium*), luzerne (*Medicago sativa*) etc. ou même chez certaines céréales (*Triticum sp.*) (Rosenberg, 1997). Ce sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses où elles se différencient en bactéroïdes (Graham, 1991 ; Haukka et al, 1998 ; Gage, 2004).

Après colonisation du système racinaire par les rhizobia de la plante hôte, il y a formation de nodules (ou nodosités) à l'intérieur desquels les rhizobia endosymbiotiques fixeront l'azote atmosphérique au bénéfice de la plante. Le développement des nodules sur les racines des plantes hôtes et l'infection des cellules végétales par ces bactéries est appelé "processus de nodulation". Les bactéries du genre *Rhizobium* se trouvent sous deux formes :

- une forme végétative (non bactéroïde) : ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes.
- une forme bactéroïde : Les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994). Cette forme peut se retrouver par exemple chez *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*.

### 3.2.2. Description de genre *Rhizobium*

Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology, le genre *Rhizobium* comprend des bacilles de taille 0,5-1,0 x 1,2-3,0 µm. Ne formant pas de spores, Gram négatif, mobiles grâce à des flagelles péritriches. Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) affirment la mobilité grâce un flagelle ou de deux à six flagelles péritriches. Sont aérobies avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons mais peuvent bien croître en faibles pression d'oxygène. En anaérobiose, elles sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons. La température optimale de croissance se situe dans l'intervalle de 25 à 30°C. Certaines espèces peuvent, cependant croître à des températures de plus de 40°C. Le pH optimum de croissance étant de 6 à 7. Les colonies sont généralement de couleur blanchâtre ou beige, de forme circulaire, convexe, translucides ou opaques, mucilagineuses et bombées. La croissance sur milieux (YMA) enrichis de carbohydrates est accompagnées de la synthèse de polysaccharides extracellulaires.

Au point de vue nutritionnel, ce sont des chimio-organotrophes utilisant pour leur croissance une large gamme de sucres (sauf l'amidon et la cellulose) et de sels d'acides organiques sans production de gaz. Les *Rhizobium* utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés; mais la majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994). Certaines souches peuvent se développer en chimiolitotrophie en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub>, d'une faible pression en oxygène et de faibles concentrations en sels d'ammonium ou de nitrate. Les sels d'ammonium, les nitrates, les nitrites et beaucoup d'acides aminés sont une source d'azote. Les *Rhizobium* n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal (NH<sub>3</sub>) ou aminé pour se développer à l'état libre. Des souches de certaines espèces peuvent croître sur des milieux simples de sels minéraux additionnés de vitamine ou d'hydrolysats de caséine en tant que seule source de carbone et d'azote à la fois (Somasegaran et Hoben, 1994). D'autres souches exigent, pour leur croissance, un ou plusieurs facteurs de croissance tels que la biotine, le pantothénate ou l'acide nicotinique. La peptone est faiblement utilisée. La caséine, l'amidon, la chitine et l'agar ne sont pas hydrolysés.

### 3. 2.3. Le microsymbiont spécifique

Parmi la diversité des associations symbiotiques répertoriées, les légumineuses de la tribu des *Viciae* comprenant principalement les genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens* a longtemps été considéré comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce bactérienne, *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Outre le biovar *viciae*, l'espèce *R.leguminosarum* comprends deux autres biovars : le symbiovar *trifolii* qui nodule les plantes du genre *Trifolium* et le symbiovar *phaseoli* qui nodule les plantes du genre *Phaseolus*. Cette classification a changé quand Ramírez-Bahena et al. (2008) ont révisé le statut taxonomique de *R. trifolii*, *R. phaseoli* et *R. leguminosarum*, en intégrant *R. trifolii* dans *R. leguminosarum* et conservant *R. phaseoli* comme espèce distincte (Riah, 2014).

D'autres espèces de *Rhizobium* ont, depuis, été décrites pour des souches capables de noduler certaines espèces de légumineuses de la tribu des *Viciae*, comme *Rhizobium fabae*, isolé à partir de nodules *Vicia faba* en Chine et capable de noduler le pois, avec des gènes *nodC* semblables à ceux trouvés chez le biovar *viciae*. Une souche nodulante *Pisum* et d'origine géographique inconnue a été classée dans une nouvelle espèce, *Rhizobium pisi*. Yang et al. (2008) ont identifié 2 souches parmi 42 nodulants *Pisum* cultivé en Chine comme *Rhizobium etli*, connu comme symbiote efficace du haricot et phylogénétiquement proche de *R. leguminosarum*. Enfin, très récemment une nouvelle espèce nodulante *Vicia faba* dans différentes régions géographiques (Espagne, Pérou et Tunisie) a été proposée dans le genre *Rhizobium*, *Rhizobium laguerreae*, nommée ainsi en hommage et à la mémoire de Gisèle Laguerre. Bien que la littérature comporte plusieurs publications concernant les légumineuses

de la tribu des *Viciae*, montrant notamment que le pois, la féverole et la gesse, partagent le même symbiote *R. leguminosarum* dans différentes régions au monde (Riah, 2014).

*R. leguminosarum* sv. *viciae* (*Rlv*) est capable de noduler toutes les espèces de légumineuses appartenant à la tribu des *Viciae* comprenant les genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens*. Cependant, un certain nombre d'études utilisant des légumineuses cultivées de la tribu des *Viciae* ont montré des différences génétiques entre les souches de *Rlv* qui les nodulent à travers tous les continents. Álvarez Martínez et al. (2009) ont suggéré une origine commune en Europe pour les souches de *R. leguminosarum* nodulant la tribu de *Viciae*, d'où elles auraient diffusées à d'autres continents. Divers travaux ont montré que dans les populations de *Rlv* isolées des nodosités racinaires, toute une variété de génotypes sont capables de noduler la même plante hôte. Cependant, la dominance d'un génotype particulier varie en fonction du génotype végétal. En effet, la diversité et la structure des populations retrouvées dans les nodosités ne sont pas toujours le reflet de la structure des populations naturelles du sol. Pour un même sol étudié, la structure des populations nodulantes se montre différente selon la plante piège utilisée. Ainsi, lorsqu'une légumineuse est en présence d'une population de *Rhizobium* qui lui est spécifique, celle-ci sélectionne préférentiellement certains génotypes pour former des nodosités racinaires. Cette sélection en fonction de la plante hôte peut être liée aux exsudats racinaires de rhizodépôt qui constituent des sources de carbone et d'énergie pour les microorganismes rhizosphériques, et de flavonoïdes privilégiant la nodulation par certains types de *Rlv*. Seules quelques études ont montré qu'au sein d'une même espèce végétale, la diversité génétique de la plante hôte influence la structure de la diversité génétique des populations de rhizobiums associées. A titre d'exemple différentes populations de *Rlv* associées à différentes lignées de pois ou de fèves. Ainsi, quelques souches bactériennes semblent être spécifiques du cultivar végétal. Par ailleurs, Harrison et al. (1987) ont décrit que le cultivar de trèfle n'a pas d'effet sur la structure des populations de *R. leguminosarum* sv. *trifolii* (Riah, 2014).

### 3. 3. Effet des métaux lourds sur les rhizobia

Certaines données de la littérature, rapportent que la présence de métaux lourds semble avoir un effet sur la fixation de l'azote atmosphérique, sur la biomasse et la taille ainsi que la diversité génétique des populations de rhizobium (Pier-Anne, 2009).

Dans cette perspective, Giller et *al.* (1989) ainsi que Angle et *al.* (1993) ont constaté que les isolats de *Rhizobium* (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*) obtenus à partir de nodosité de trèfle blanc (*Trifolium repens* L) cultivé sur un sol contaminé par le Cu, le Zn et surtout le Cd, étaient inefficaces par comparaison avec des souches efficaces issues d'un sol non contaminé (Pier-Anne, 2009).

Rother et *al.* (1983), selon des essais faits sur des sols contaminés par le Cd, le Zn et le Pb, ont rapporté uniquement une perte mineure de l'activité nitrifiante, de la taille de plantes et de la nodulation. En effet, la capacité fixatrice d'azote est maintenue. De même, un retard de nodulation a été démontré par Martensson et Witter (1990). La diminution de la taille des populations de rhizobium en rapport avec l'augmentation des teneurs en métaux dans le sol et le temps d'exposition est actuellement bien étudiée (Pier-Anne, 2009)

Les travaux de McGrath et *al.* (1988) ainsi que Martensson (1992) désignent le zinc comme le principal responsable de la diminution de la taille des populations de *Rhizobium* du sol. Cependant, il est possible que la présence d'autres métaux dans le sol amplifie l'effet toxique du zinc. La toxicité des métaux serait de plus aggravée par la réduction du pH des sols (Pier-Anne, 2009).

En outre, la sensibilité des populations de rhizobium semble donc dépendante des concentrations de métaux dans le sol, de la nature du sol et du contaminant. Ces bactéries pouvant disparaître lorsque le seuil de toxicité est dépassé. Ceci a été observé au laboratoire, à des concentrations supérieures à 385 mg/kg de sol et à 7 mg/Kg de sol respectivement pour le Zn et le Cd et pour un temps d'exposition de 8 mois (Pier-Anne, 2009). Durant les mêmes expériences Chaudri et *al.* (1993) ont constaté que le Ni ne présente pas d'effet sur les rhizobies à des concentrations de 54 mg/Kg de sol. Alors que le Cu entraîne uniquement l'abaissement du nombre des cellules à des concentrations supérieures à 128 mgCu/kg de sol (Pier-Anne, 2009).

Selon Dahlin et *al.* (1997), l'effet des métaux sur la structure des communautés de rhizobium serait graduel avec l'augmentation des concentrations des métaux, plutôt que liés à un seuil de toxicité observé à long terme (Pier-Anne, 2009).

À long terme, la contamination des sols par les métaux affecterait la diversité génétique des populations de rhizobium. Selon Giller et *al.* (1989). L'absence de diversité génétique serait illustrée par des profils plasmidiques tous similaires, comparée à l'hétérogénéité des

génotypes des isolats obtenus sur un sol non pollué (Pier-Anne, 2009). Ce résultat a été confirmé par l'analyse des profils RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Pier-Anne, 2009).

Diaz-Ravina et *al.* (1994) ont constaté que la tolérance de certaines espèces pourrait être obtenue ou augmentée par mutation. De même, la capacité de survivre des souches métal-tolérantes préexistantes les rendrait dominantes (modification des proportions relatives des espèces de rhizobium) (Pier-Anne, 2009). Par ailleurs, les approches moléculaires de caractérisation génotypique des isolats (PCR-RFLP de régions d'ADN ribosomique) et l'analyse des contenus plasmidiques (profils plasmidiques) ont permis de visualiser un changement de la structure des communautés et des populations de *Rhizobium*, ainsi que de la diversité, suite à la contamination du sol par le cuivre (Pier-Anne, 2009).

# CHAPITRE DEUX

## MATERIEL ET METHODES



## 1. Isolement des bactéries à partir des nodules

### 1.1. La collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de deux espèces de légumineuses différentes qui sont *Pisum sativum* (pois), *Vicia faba* (la fève). L'échantillonnage est réalisé au niveau de la région de Zighoud Youssef (Constantine), la collecte des échantillons est effectuée aux mois de Février selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). On creuse environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur pour extraire la plante et son appareil racinaire. On débarrasse soigneusement le sol lié au niveau des racines pour ne pas endommager les nodules. Enfin on place le tout dans un sac en plastique qu'on achemine au laboratoire.

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau courante pour éliminer toute trace de terre. Les nodosités sont détachées à 1-2mm du site d'attache, puis rincées et séchées par du papier filtre.



Photographie 3 : *Pisum sativum*



Photographie 4 : *Vicia faba*

## 1.2. Conservation des nodules

La méthode de conservation utilisée est celle décrite par Vincent (1970) qui repose sur la dessiccation des nodules dans des flacons adéquats contenant du Chlorure de calcium anhydre ( $\text{CaCl}_2$ ) (Figure 2). Par cette méthode les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois. Chaque flacon sera identifié par une étiquette portant les informations suivantes :

- Le nom de la plante hôte,
- Le lieu et date de prélèvement;
- La date de conservation.

Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'à 48h.

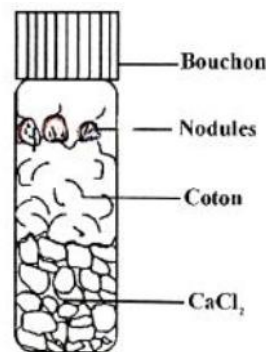


Figure 5: Conservation des nodules sous  $\text{CaCl}_2$  (Vincent, 1970).

## 1.3. Isolement des souches à partir des nodules

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que ceux qui sont conservés par dessiccation sont réhydratés pendant 24 heures au réfrigérateur dans l'eau distillée, puis laissés une heure à la température ambiante (Vincent 1970).

### 1.3.1. Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol  $95^\circ$  pendant 5 à 10 seconds, puis transférés dans le Chlorure de mercure acidifié 0.1% (1 g  $\text{HgCl}_2$  +5 ml HCl +1 L d'eau distillée) pendant 3minutes. On effectue ensuite un rinçage des nodules à l'eau distillée stérile (10 fois), puis laisser gonfler après le 10ème rinçage (Vincent, 1970).

Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

### 1.3.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Avant d'écraser le nodule selon la technique préconisée, on effectue un ensemencement du nodule entier sur les milieux YMA + rouge Congo et GPA + Pourpre de bromocrésol (**Annexes 1**). C'est une étape nécessaire pour vérifier la bonne stérilisation du nodule.

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile dans lesquelles les nodules sont imbibés. Les nodules sont ensuite écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, une suspension de nodule est prélevée et étalée selon la technique des quatre cadrons sur milieux (YMA+RC et GPA+BCP) (**Annexes 1**) coulé en boîte. On récupère le jus restant par un ensemencement sur bouillon YMB (**Annexes 1**), puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures (Vincent, 1970).

## 1.4. Caractères morphologique et cultureux des isolats

### 1.4.1. Culture sur YMA

Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sur milieu YMA et n'ayant pas acidifié le milieu GPA+BCP sont prises en considération. Une observation microscopique (coloration de Gram) et un examen morphologique des colonies sur YMA (**Annexes 1**). Sont réalisés sur les isolats avant d'être conservés (Vincent, J.M.1970 ; Beck et *al.*1993).

### 1.4.2. Vitesse de croissance

Les colonies suspectées et retenues sont ensemencées sur milieu YMA + Bleu de Bromothymol (**Annexe 1**). Ce milieu permet de distinguer les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*) et bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

## 1.5. Conservation des souches

Avant de conserver les souches elles sont mises en culture sur bouillon YMB 24h à 28°C puis conservés sur YMA tamponné avec du CaCO<sub>3</sub> (3g/l) (**Annexe 1**) (Vincent, J.M.1970 ; Beck et *al.*1993). Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les boîtes sont conservées à 4°C au réfrigérateur.

**Tableau 1** : les souches utilisées dans notre étude

Code des souches	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Source
<b>A6</b>	<i>Rhizobium sllae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine, Algérie	<b>A.Benguedouar, Constantine</b>
<b>CIII</b>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	<b>S.Dekkiche, Constantine</b>
<b>T</b>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolli</i> 843			<b>B.J.Rolfe, Camberra</b>
<b>p</b>	Notre étude	<i>Pisum sativum</i>	Constantine, Algérie	<b>Cette étude</b>
<b>VF 1</b>	Notre étude	<i>Vicia faba</i>	Constantine, Algérie	<b>Cette étude</b>
<b>VF 2</b>	Notre étude	<i>Vicia faba</i>	Constantine, Algérie	<b>Cette étude</b>
<b>VF 3</b>	Notre étude	<i>Vicia faba</i>	Constantine, Algérie	<b>Cette étude</b>

## 1.6. Recherche d'enzymes spécifiques

### 1.6. 1. Réduction des nitrates (nitrate-réductase)

Les isolats sont cultivés sur milieu le bouillon Tryptone - Yeast (TY) dans des tubes à essai contenant 0.1% de KNO<sub>3</sub> (p/v) (**Annexes1**). Après 4 jours d'incubation à 28°C, on rajoute dans le milieu inoculé 3 à 4 gouttes de chacun des réactifs nitrate réductase I et II. S'il

y a une coloration rouge, les souches ont une nitrate réductase positive (les nitrates sont réduits en nitrites), si non, on additionne la poudre de zinc, un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche a une nitrate réductase, alors que la couleur rouge signifie la non réduction des nitrates (Guiraud, 1998).

### **1.6.2. Hydrolyse de l'urée (uréase)**

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012 g de rouge de phénol (indicateur de pH). Le milieu sans urée est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22 µm) et ajoutée au milieu en phase liquide. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures (Somasegaran et Hoben, 1994).

### **1.6.3. Activité cellulolytique**

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode modifiée du rouge Congo de Teather et Wood (1982), composé capable de se lier de manière stable à une molécule non dégradable de Carboxyméthylcellulose (CMC). Les isolats sont mis en culture sur milieu YMA contenant 0.25% (p/v) de CMC pendant 5 jours à 30°C. Après incubation les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante, puis les boîtes remplies d'une solution de rouge Congo (1mg /ml) et incubées pendant 30 minutes à 30°C. La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M, les boîtes sont laissées à température ambiante puis vidées (Struffi et al.1998). L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique la présence d'une endoglucanase.

## **2. Résistance intrinsèque aux métaux lourds**

Dans des flacons contenant 100ml de milieu Mueller-Hinton on ajoute diverses concentrations d'une solution-stock de chacun des métaux lourds ( $ZnSO_4$ ,  $Pb(COO)_2$ ,  $CdCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $HgCl_2$ ). Les boîtes sont subdivisées en 4 portions, chacune estensemencée par une souche ou isolat puis incubée pendant 7 jours à 28°C.

La préparation des solutions stock des métaux lourds s'effectue en dissolvant 1g de chaque métal dans 100ml d'eau distillée. Les solutions sont stérilisées 20mn à 120°C. Les quantités correspondantes aux concentrations choisies sont rajoutées dans les milieux.

**Tableau 2** : les concentrations des métaux lourds utilisées

Métaux	Concentrations en µg/ml de milieu Muller-Hinton			
ZnSO <sub>4</sub>	100	200	500	<b>1000</b>
Pb (COO) <sub>2</sub>	500	1000	1500	<b>2000</b>
CdCl <sub>2</sub>	100	250	500	<b>1000</b>
CuSO <sub>4</sub>	200	500	1000	
HgCl <sub>2</sub>	5	10	20	

### 3. Mesure de la croissance en milieu liquide des souches en présence des métaux lourds

Différentes concentrations des mêmes métaux utilisés précédemment sont ajoutés à des flacons contenant chacun 150 ml de milieu TY, ces derniers sont ensuite autoclavés pendant 20 minutes à 120°C.

L'inoculum de chacune des souches est réalisé dans un tube de 7,5ml de TY et incubé 24h à 28°C et servira pour suivre la croissance de ces souches dans un flacon de 150ml de milieu TY contenant différentes concentrations en métaux lourds.

La mesure de la croissance est mesurée pendant 48 heures dans un spectrophotomètre (JENWAY 6305) où la densité optique est relevée toutes les deux heures à une longueur d'onde de 600 nm ( $DO_{\lambda,600}$ ).

**Tableau 3** : Concentrations des Métaux lourds utilisées

Métaux	Concentrations en µg/ml de milieu TY (Beringer, 1974)	
ZnSO <sub>4</sub>	1500	2000
Pb (COO) <sub>2</sub>	2500	3000
CdCl <sub>2</sub>	50	100
CuSO <sub>4</sub>	1500	2500
HgCl <sub>2</sub>	20	50

# CHAPITRE TROIS

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

## 1. Caractérisations morphologiques et culturaux des isolats

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de deux espèces de légumineuses différentes qui sont *Pisum sativum* (le pois) et *Vicia faba* (la fève) nous avons pris en considération quatre isolats dont les colonies absorbent très peu le rouge Congo.

### 1.1. Croissance des isolats sur milieu YMA

Après 24h d'incubation les colonies apparaissent sur le milieu YMA, avec une couleur crème ou blanche, de taille variable ayant une forme circulaire bombée, de texture translucide ou opaque et d'un aspect de surface lisse et brillant. Ces résultats sont en parfait accord avec la description des rhizobia par Jordan (1984). (Photographie 5)



**Photographie 5** : Aspect des colonies de VF2 sur le milieu YMA

### 1.2. Croissance sur YMA+ rouge Congo

La croissance sur le milieu YMA+rouge de Congo est détectable après 48h d'incubation et donne des colonies lisses, visqueuses. Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le rouge de Congo. Cette observation est commune chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).



Le rouge de Congo est ajouté aux milieux de culture pour assurer l'isolement des rhizobia ou tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être considéré comme un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries. (Photographie 6)



**Photographie 6** : Aspect des colonies de VF2 sur le milieu YMA+rouge Congo

### 1.3. Observation microscopique

La coloration de Gram et l'observation microscopique révèle des bacilles à Gram négatifs (couleur rose) (photographie 7).



**Photographie 7** : Observation microscopique des bactéries x 100

### 1.4. Croissance sur milieu YMA au Bleu de Bromothymol

L'ensemble des isolats VF1, VF2, VF3 et P acidifient le milieu YMA +Bleu de Bromothymol (un virage de couleur du vert vers le jaune) en moins de 24h, ce qui implique que nos isolats appartiennent à des bactéries à croissance rapide. (Photographie 8)

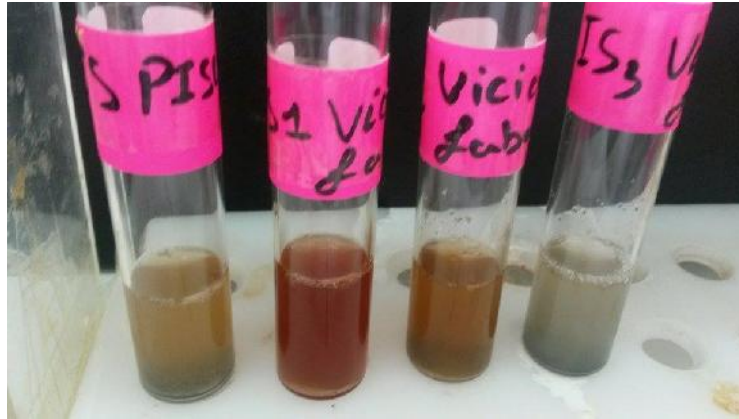


Photographie 8 : Croissance de VF3 sur YMA+BTB

## 2. Recherche des enzymes spécifiques

### 2.1. Réduction de nitrate

Après 72h d'incubation la croissance des isolats sur milieu à base de  $\text{KNO}_3$ , après addition de réactifs 1 et 2 de la nitrate-réductase, montre la présence d'une nitrate-réductase. La couleur rouge orangé indique une réduction des nitrates en nitrites pour les isolats VF1 et VF2 alors que le bouillon des autres isolats VF3 et P et souches témoins reste incolore. L'addition de la poudre de zinc révèle un milieu incolore indiquant que le stade nitrate est dépassé, donc les souches ont une nitrate-réductase. (Photographie 9)



**Photographie 9** : Recherche du nitrate réductase

## 2.2. Activité cellulolytique

Toutes les souches donnent une réaction positive. Après 5 jours d'incubation l'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies des souches de référence et des isolats indique la présence d'une endoglucanase (cellulase) (Lindström et Lehtomäki ,1988) .Ont confirmé la présence de l'activité d'enzymes cellulolytiques dans toutes les souches de *Rhizobium*. (Photographie 10)



**Photographie 10**: Activité cellulosique chez P

## 2.3. Hydrolyse de l'urée

Toutes les souches de référence et les isolats produisent une uréase sur milieu spécifique additionné d'urée. Sa présence se manifeste par une alcalinisation du milieu (production de  $\text{NH}_3$ ) (photographie 11).



**Photographie 11** : Hydrolyse de l'urée chez VF 1

**Tableau 5** : Production d'enzymes spécifiques par les isolats et souches de référence

Souches	Nitrate-Réductase	Cellulase	Uréase
VF1	+	+	+
VF2	+	+	+
VF3	+	+	+
P	+	+	+
<i>R.sullae</i>	+	+	+
<i>R.l.bv viceae</i>	+	+	+
<i>Mesorhizobium</i> sp	+	+	+

### 3. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

A partir des concentrations de métaux lourds utilisées, il s'avère que

- Souches et isolats sont résistants aux concentrations de métaux lourds utilisées
- Seul le chlorure de Cd inhibe la croissance de pratiquement toutes les souches exceptée l'espèce *R. leguminosarum* bv *trifolii*. Toutefois il apparaît que le sulfate de Cu affecte la croissance des isolats de *Vicia faba*, même s'il n'est pas considéré comme métal toxique.

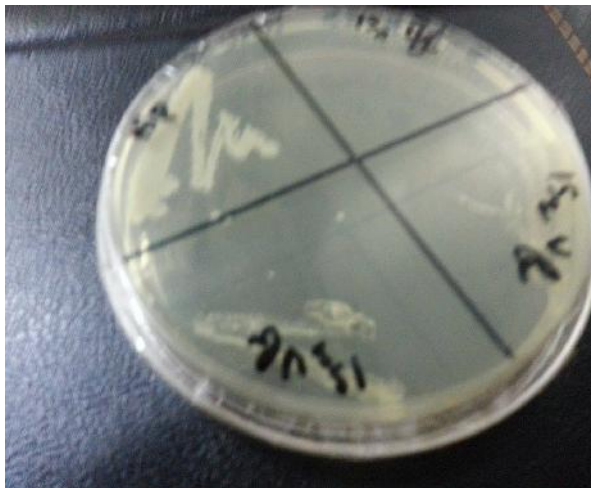


**Photographie 12** : Croissance des isolats en présence de  $ZnSO_4$

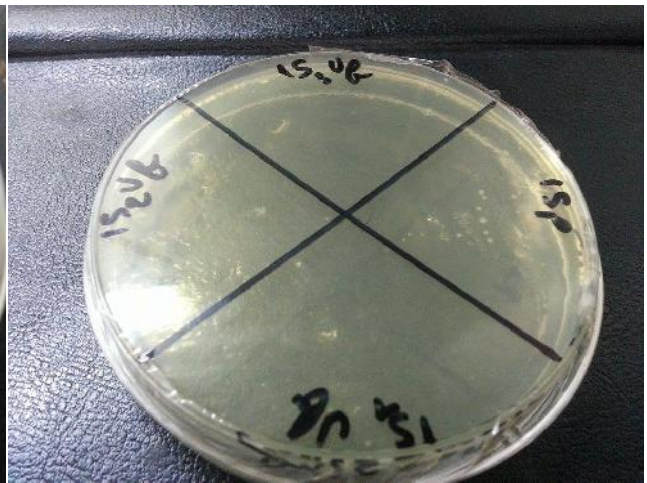


**Photographie 13** : Croissance des isolats en présence de  $Pb(COO)_2$





**Photographie 14** : Croissance des isolats en présence de  $\text{CuSO}_4$



**Photographie 15** : Croissance des isolats en présence de  $\text{CdCl}_2$

Tableau 6 : Détermination de la CMI des métaux lourds

Métaux	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ de milieu Muller-Hinton)	P	VF1	VF2	VF3	<i>R.sullae</i>	<i>R.l.bv trifolii</i>	<i>Mesorhizobium sp</i>
<b>Zinc</b>	100	++ +	++	+++	++	+++	++	+++
	200	++	++	+++	+++	+++	++	+++
	500	++	++	+++	++	+++	++	+++
	1000	++	++	+++	++	+++	++	+++
<b>Plomb</b>	500	++ +	++	+++	++	+++	++	+++
	1000	++	++	+++	++	+++	++	+++
	1500	++	++	+++	++	+++	++	+++
	2000	++	+	+++	+	+++	++	+++
<b>Cuivre</b>	200	++ +	+++	+++	+++	+	+	+
	500	++ +	-	++	++	++	++	+++
	1000	++	-	-	+	+++	+++	+++
<b>Cadmium</b>	100	-	-	-	-	-	+++	+++
	250	-	-	-	-	-	+++	+++
	500	-	-	-	-	-	++	-
	1000	-	-	-	-	-	+	-
<b>Mercure</b>	5	++	++	+++	++	+	++	+
	10	++	+	+++	++	+	++	+
	20	++	-	++	++	+	++	+

+++ : Très bonnes croissance    ++ : Bonne croissance    + : Faible croissance

- : Absence de croissance

#### **4. Mesure de la croissance des souches en présence des métaux lourds**

La mesure de la  $DO_{\lambda,600}$  en présence et en absence de différents métaux lourds a donné les résultats suivants. Chaque représentation graphique illustre l'absorption des souches et isolats en présence d'un métal à deux concentrations différentes :



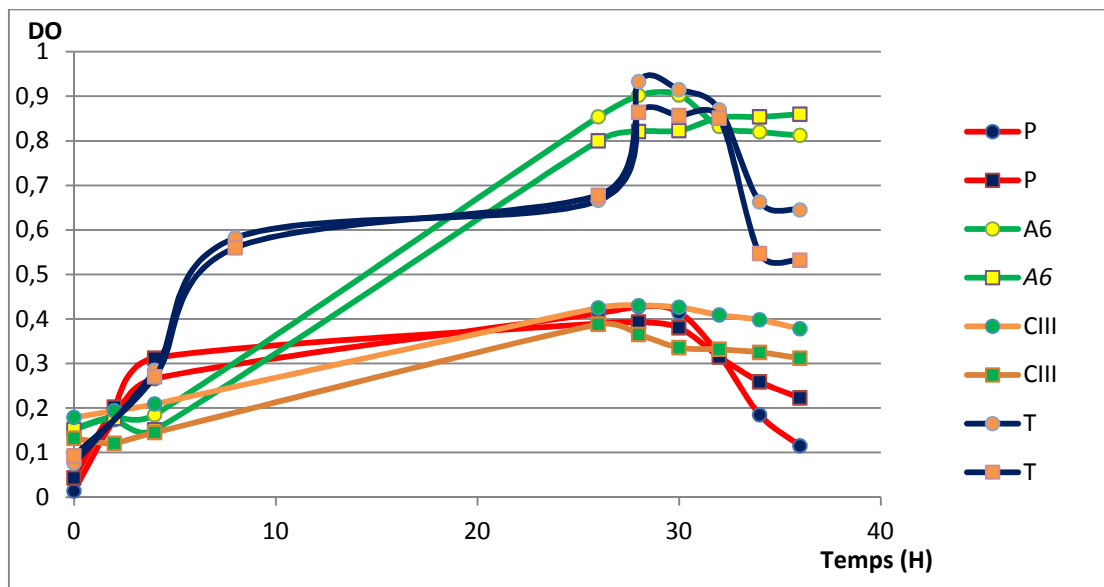
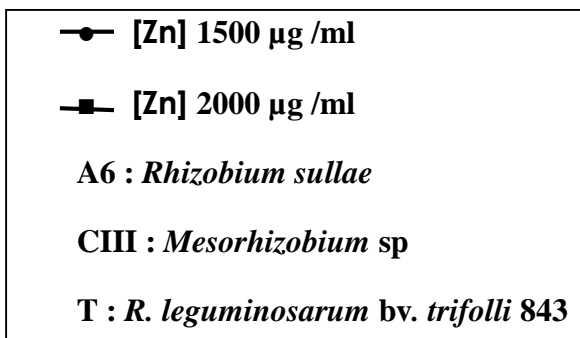


Figure 6 : Croissance des souches sur Milieu TY en présence de ZnSO<sub>4</sub>

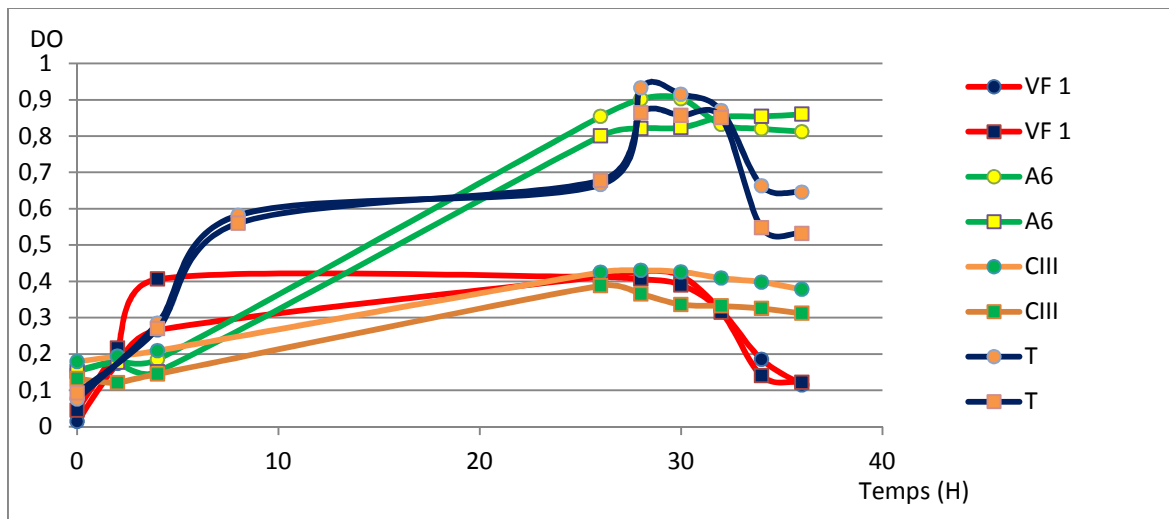


Figure 7 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de ZnSO<sub>4</sub>

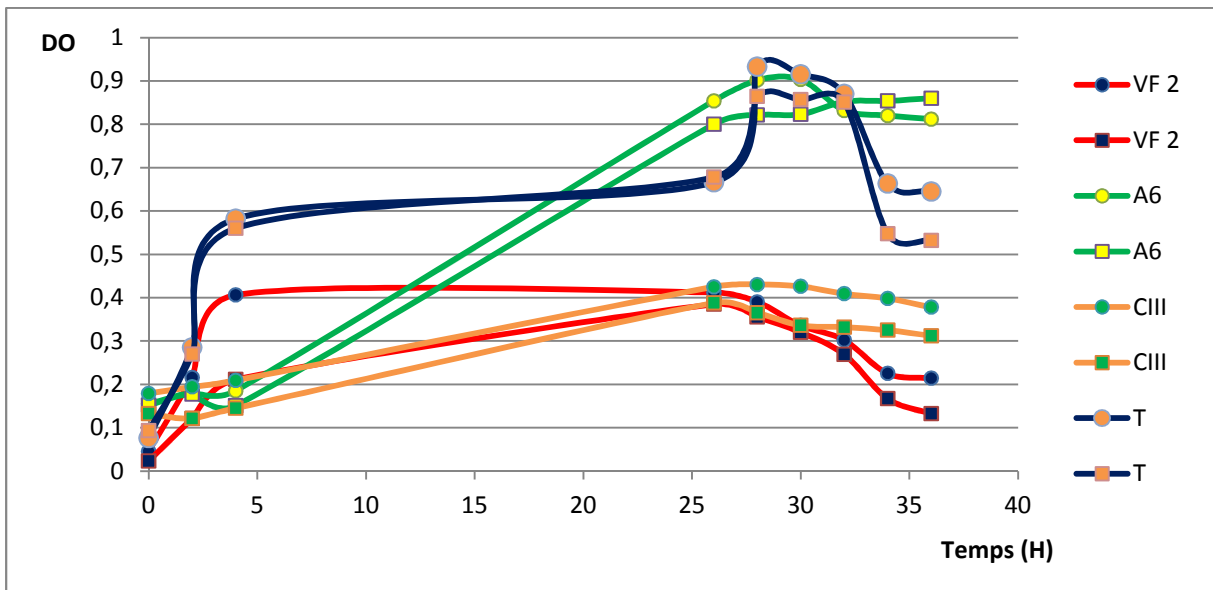


Figure 8 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $ZnSO_4$

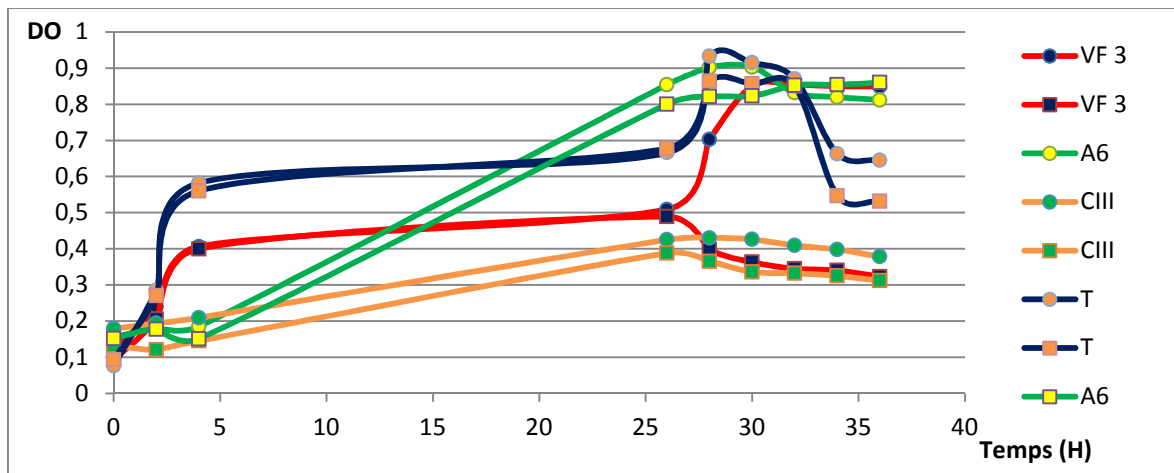


Figure 9 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $ZnSO_4$

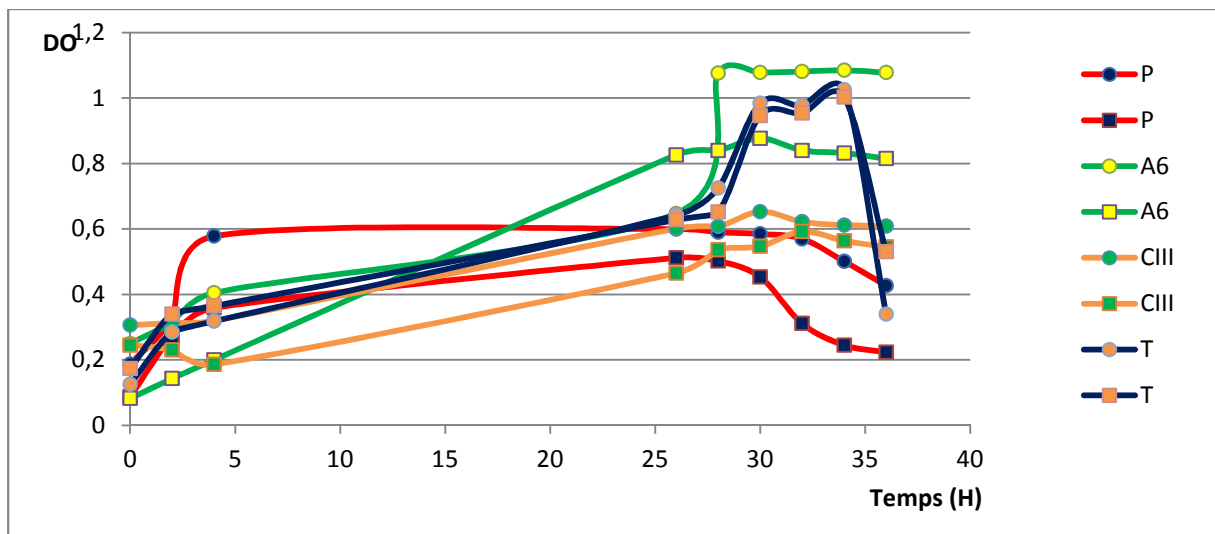
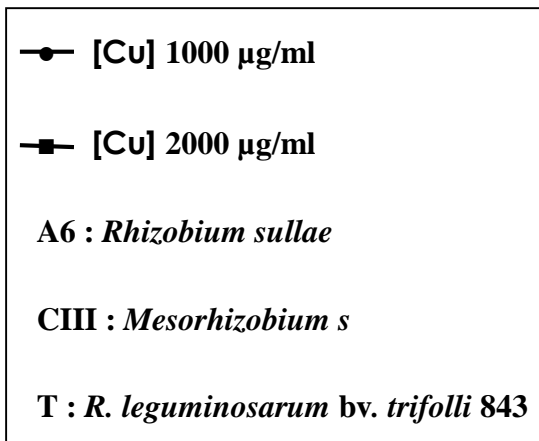


Figure 10 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $\text{CuSO}_4$

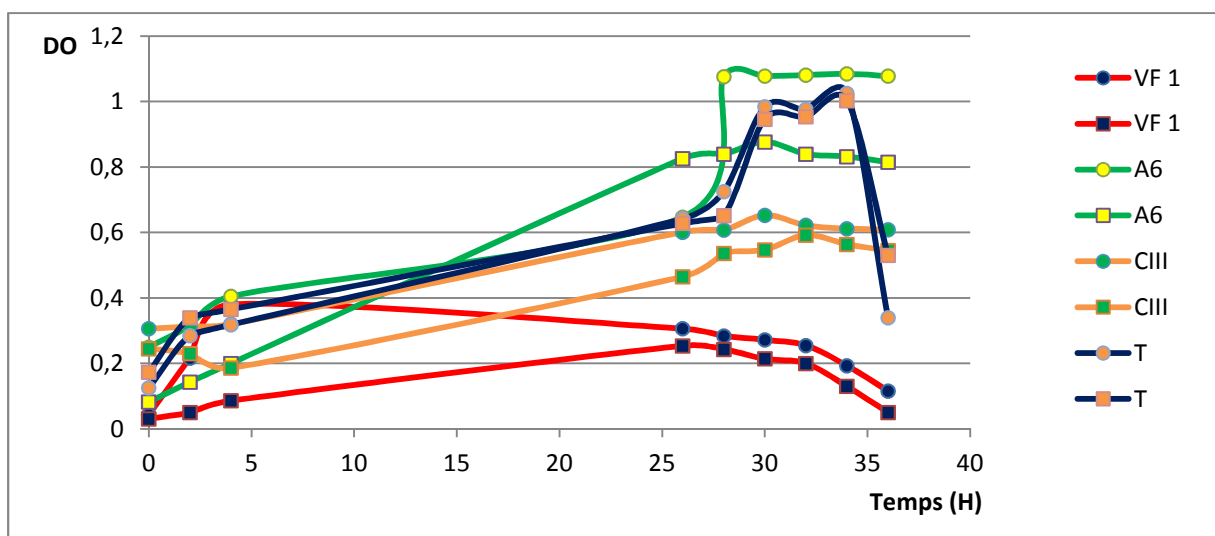


Figure 11 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $\text{CuSO}_4$

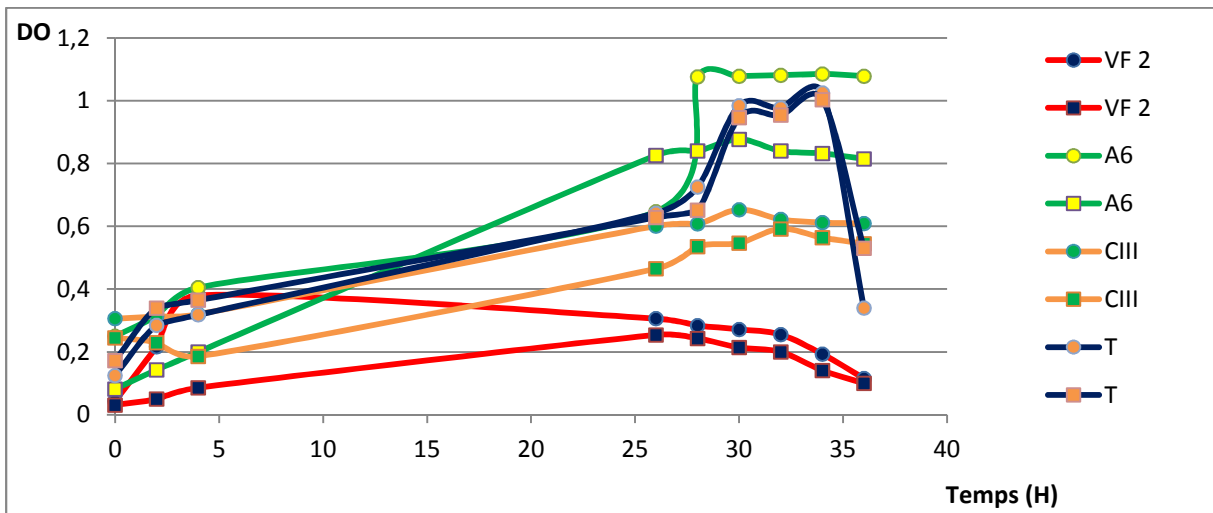


Figure 12 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de CuSO<sub>4</sub>

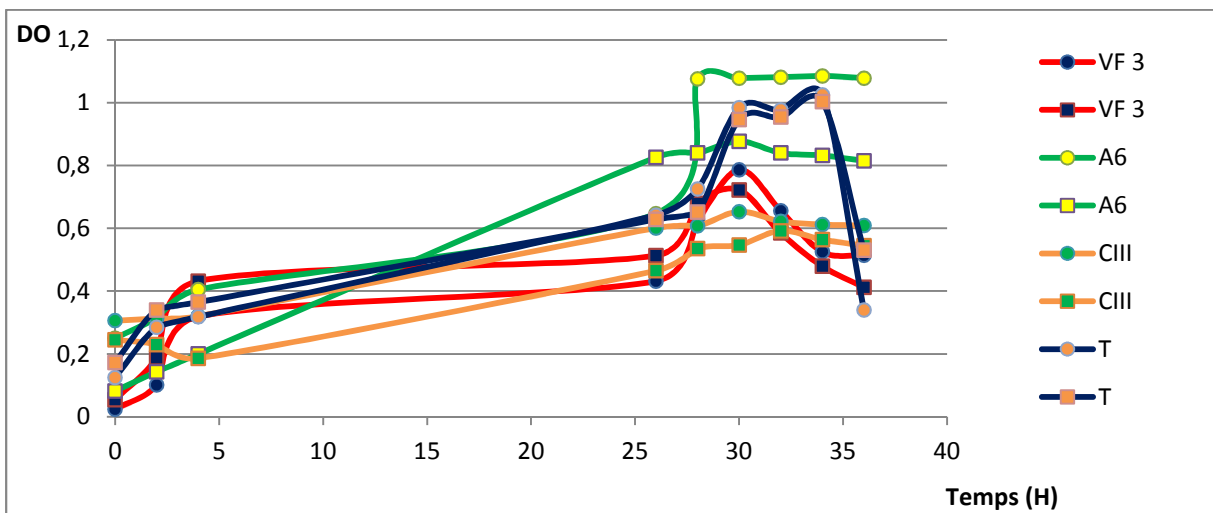


Figure 13 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de CuSO<sub>4</sub>

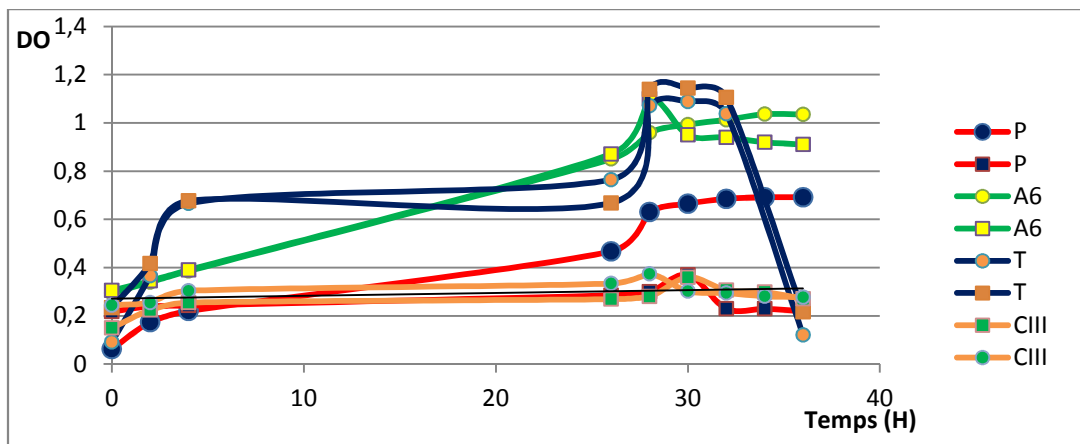
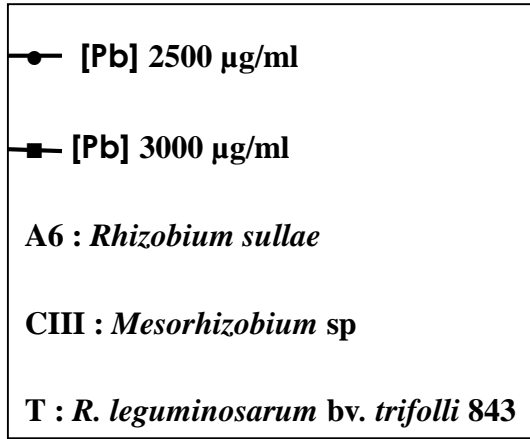


Figure 14 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $Pb(COO)_2$

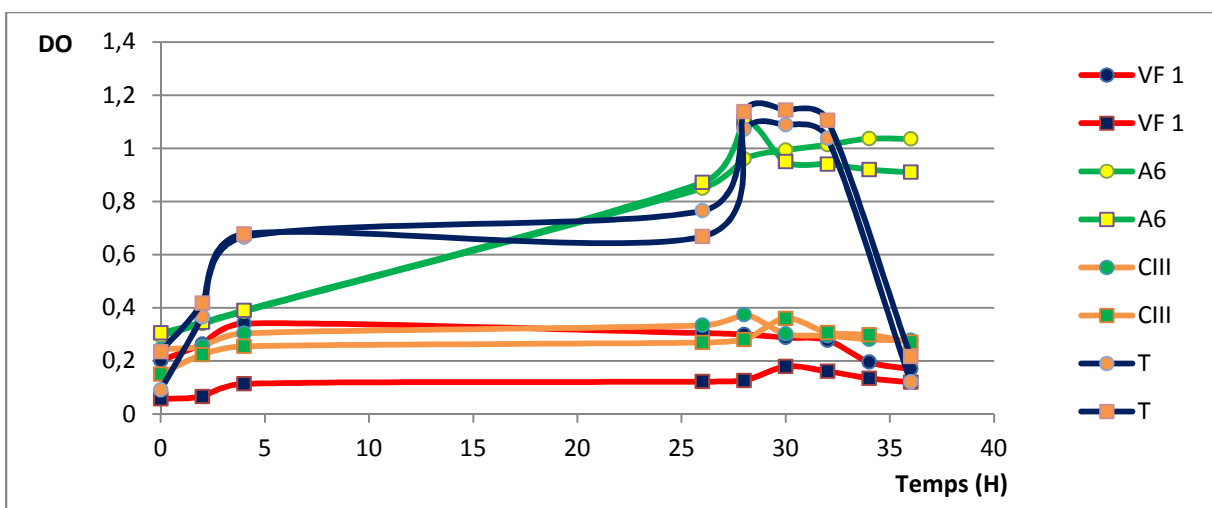


Figure 15 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $Pb(COO)_2$

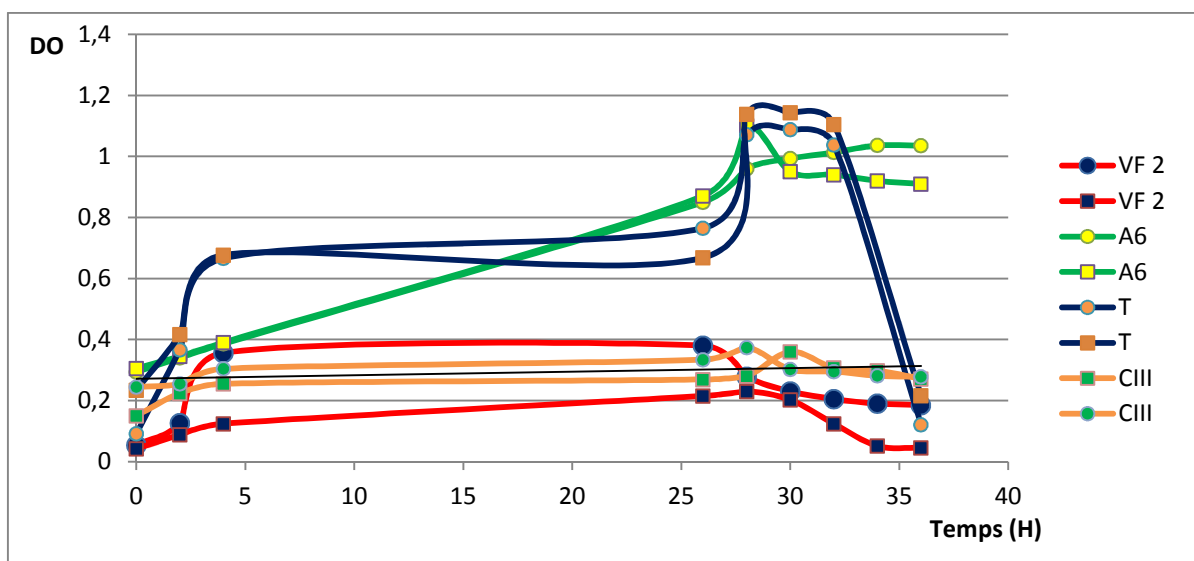


Figure 16 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $Pb(COO)_2$

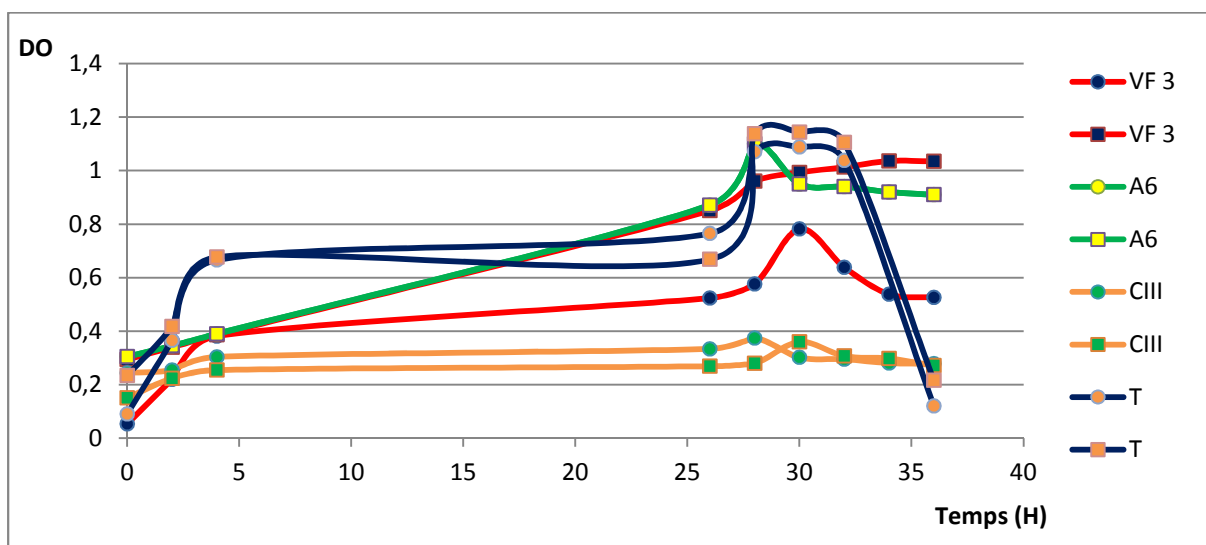


Figure 17 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de  $Pb(COO)_2$

● [Hg] 20 µg/ml  
 ■ [Hg] 50 µg/ml  
 A6 : *Rhizobium sultae*  
 CIII : *Mesorhizobium sp*  
 T : *R. leguminosarum bv. trifolli 843*

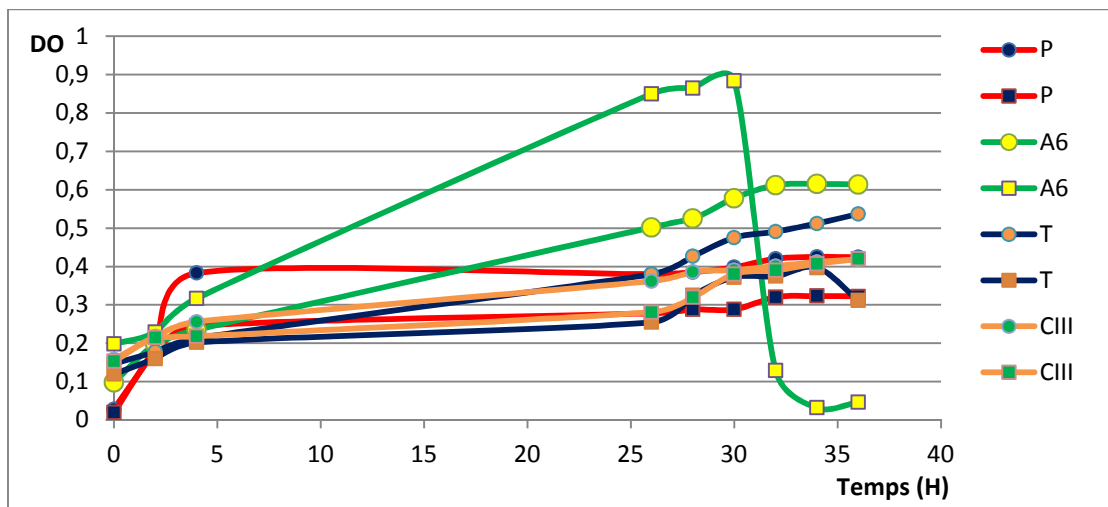


Figure 18 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence de HgCl<sub>2</sub>

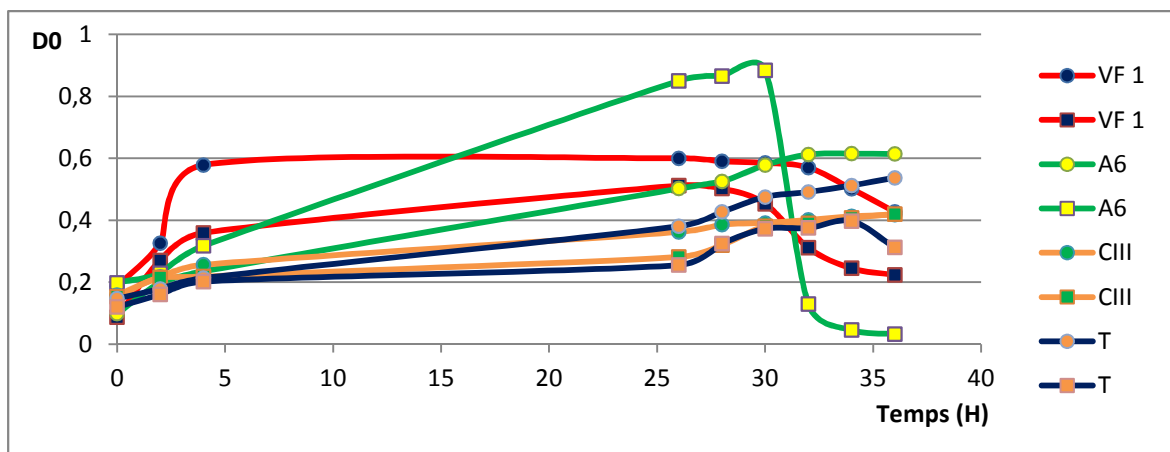


Figure 19 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence HgCl<sub>2</sub>

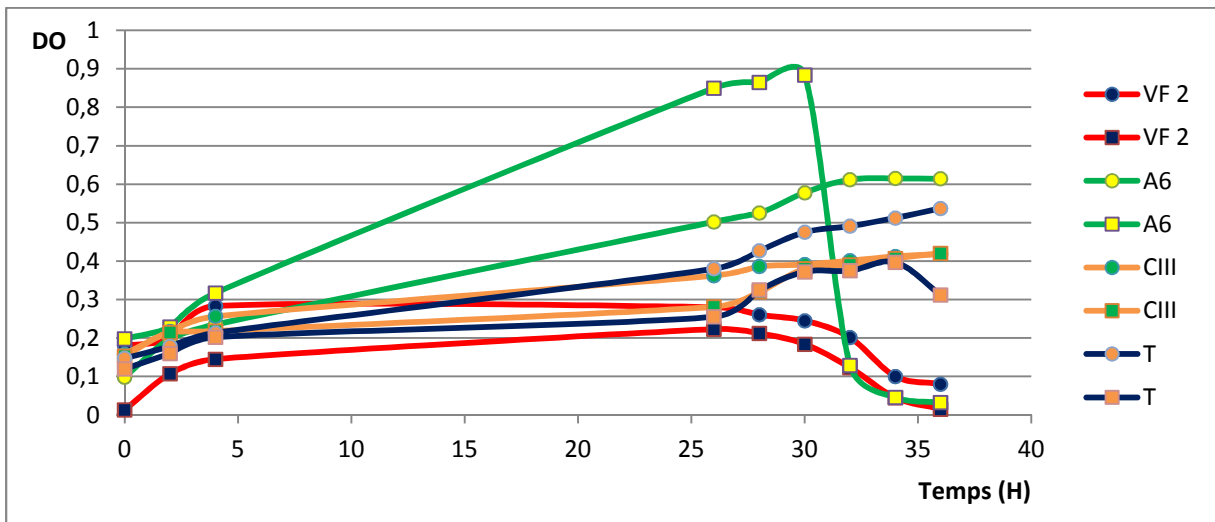


Figure 20 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence  $HgCl_2$

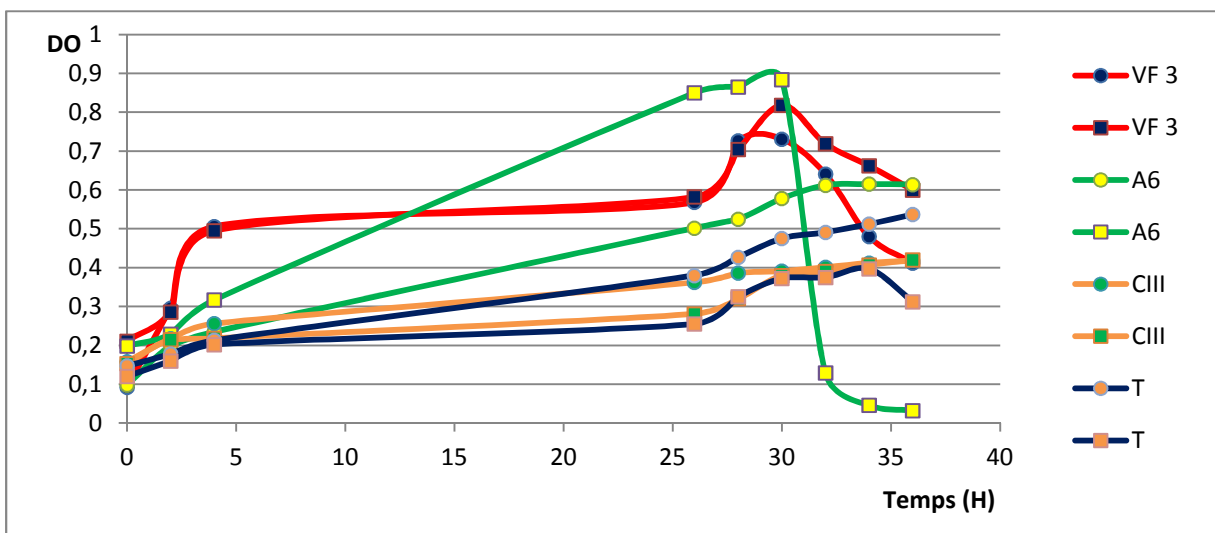


Figure 21 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence  $HgCl_2$



● [Cd] 50 µg/ml  
 ■ [Cd] 100 µg/ml  
 A6 : *Rhizobium sultae*  
 CIII : *Mesorhizobium* sp  
 T : *R. leguminosarum* bv. *trifolli* 843

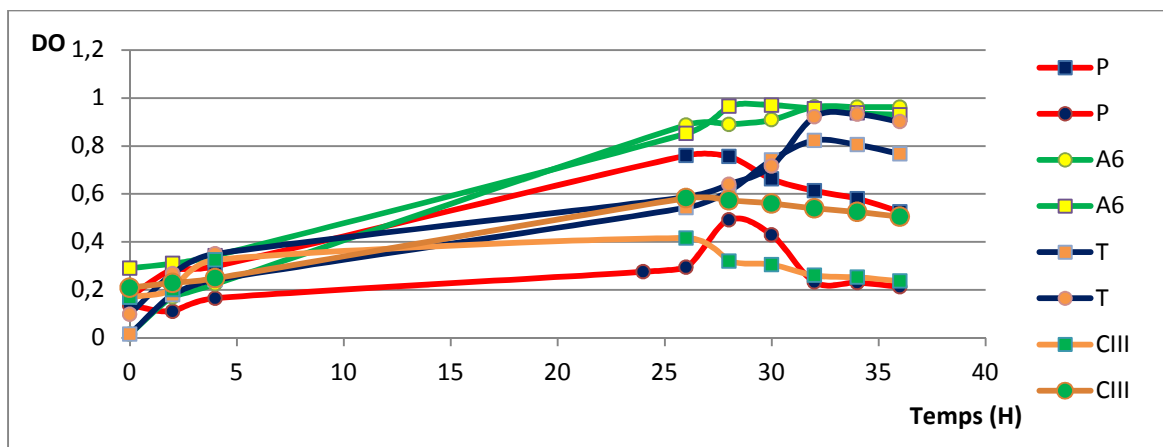


Figure 22 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence CdCl<sub>2</sub>

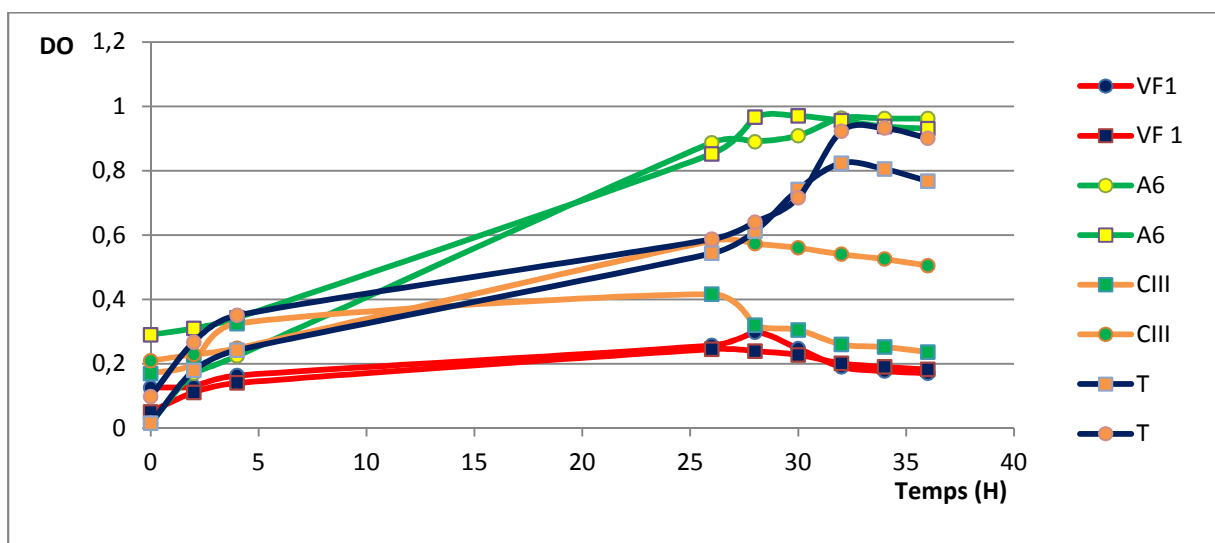


Figure 23 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence CdCl<sub>2</sub>

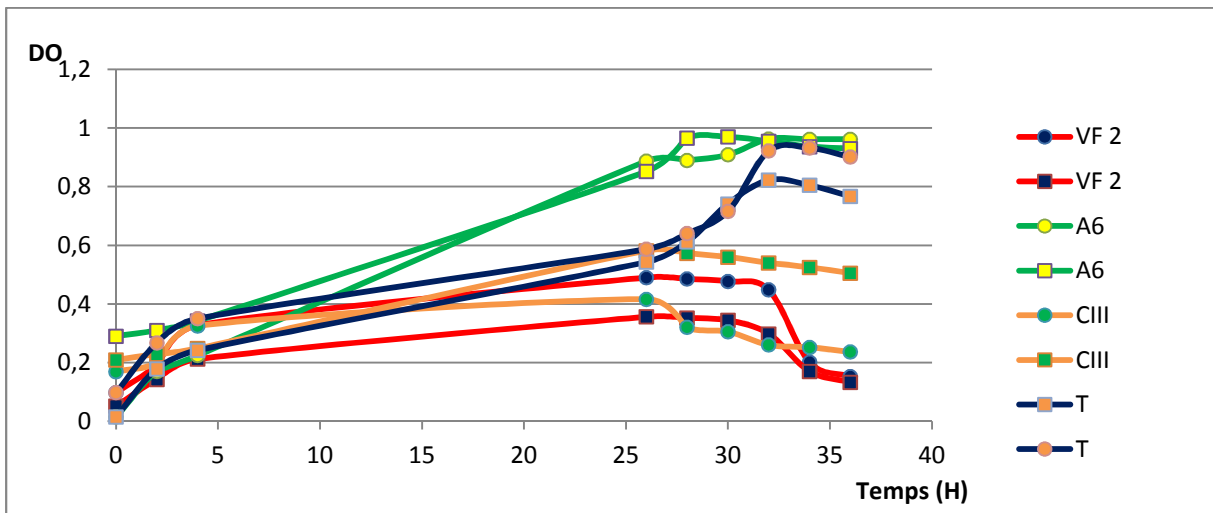


Figure 24 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence CdCl<sub>2</sub>

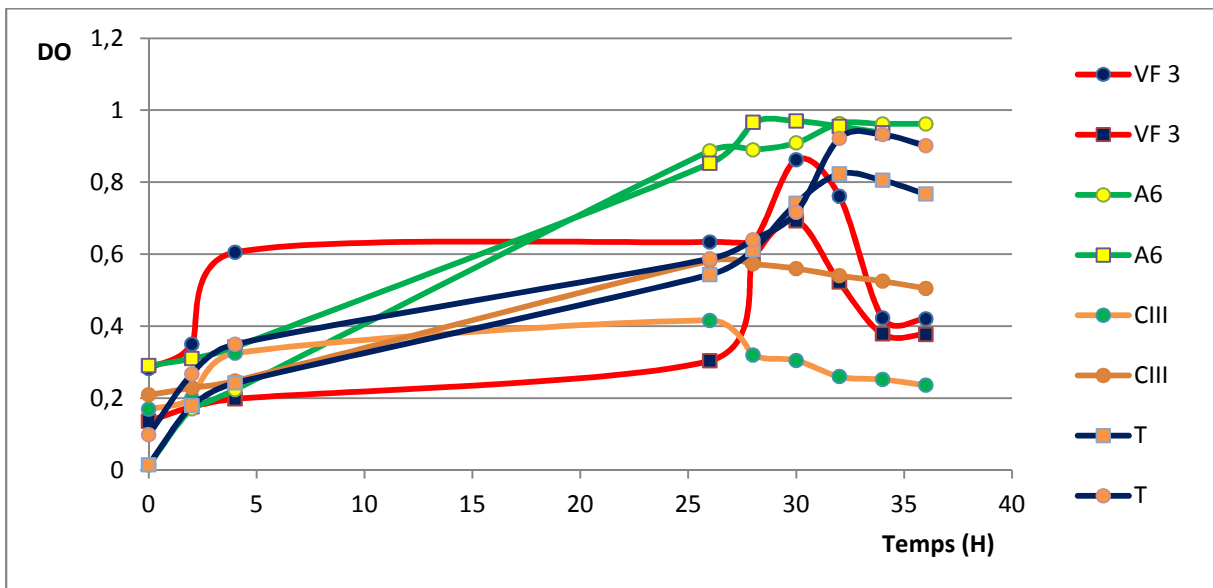
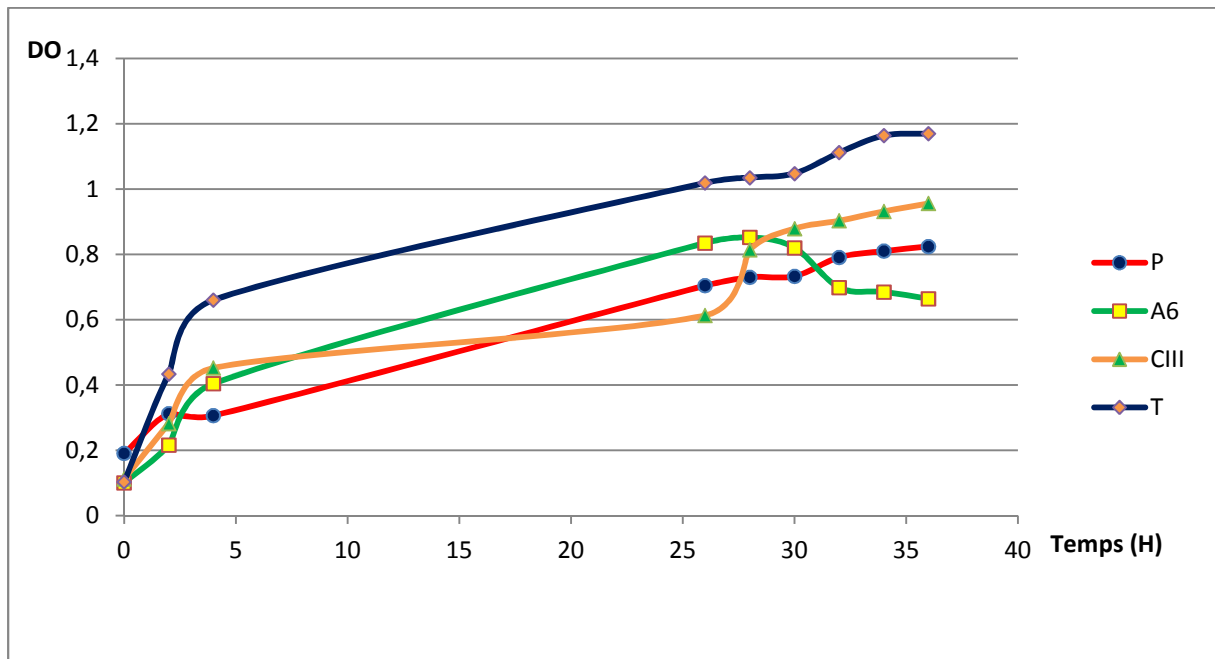
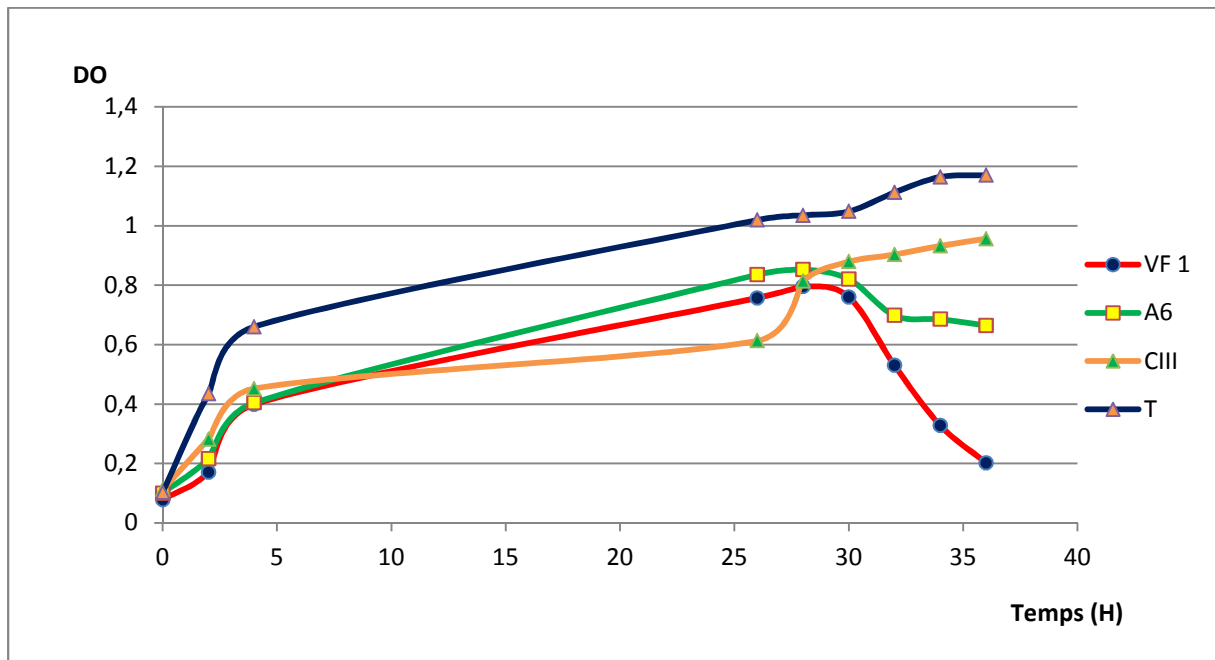


Figure 25 : Croissance des souches sur bouillon TY en présence CdCl<sub>2</sub>



**Figure 26 :** Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds



**Figure 27 :** Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds

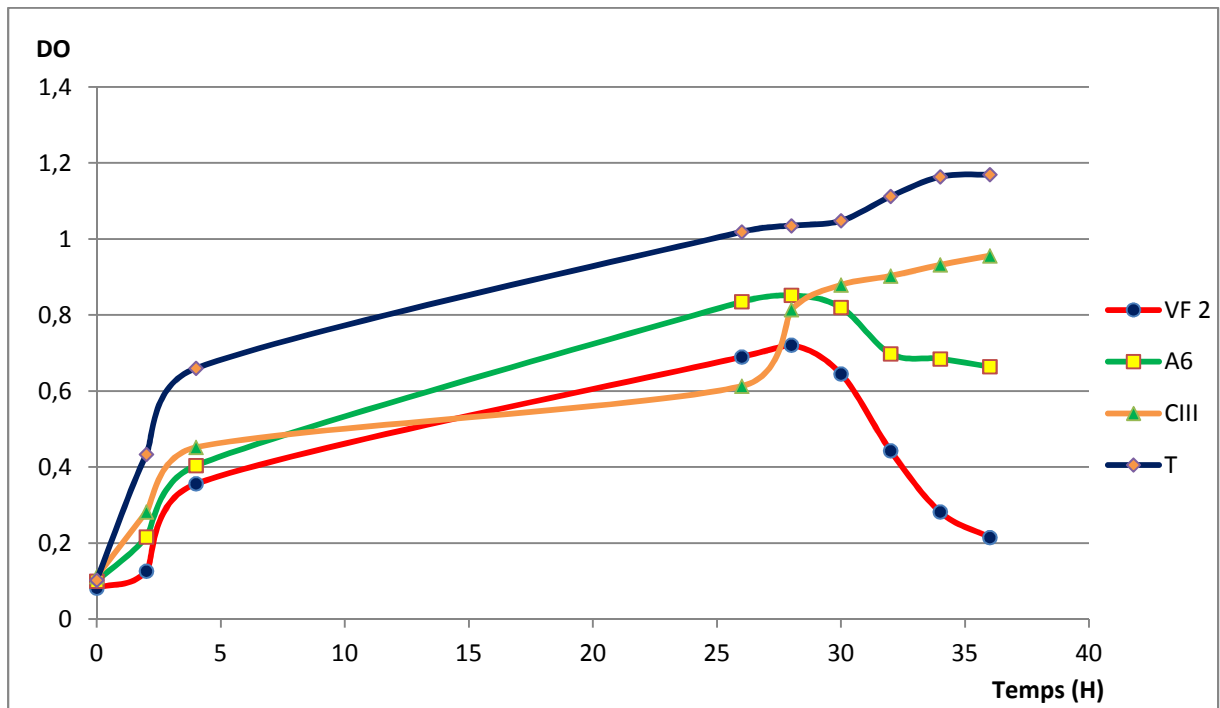


Figure 28 : Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds

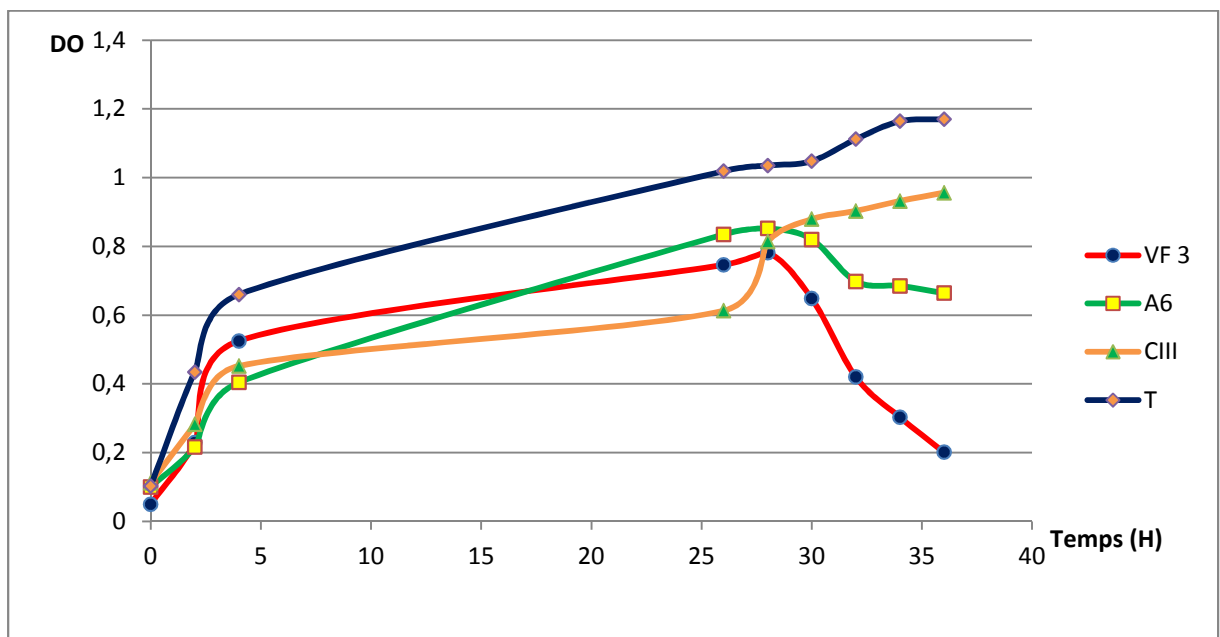


Figure 29 : Croissance des souches sur bouillon TY en absence des métaux lourds

## Discussion

A travers les résultats obtenus, après caractérisation des souches isolées à partir des nodules de deux légumineuses, *Vicia faba* et *Pisum sativum*, les colonies sur YMA+rouge Congo et YMA présentent un aspect et une morphologie conformes aux rhizobia et B.N.L. (bactéries nodulant les légumineuses) (Jordan, 1984, Vincent, 1970). Les isolats, en présence de souches de référence, se cultivent en 24h sur milieu YMA+bleu de bromothymol, et donc sont considérées comme des bactéries à croissance rapide (Jordan, 1984). La recherche d'enzymes spécifiques révèle que qu'ils sont présents chez toutes les souches et isolats. Ce résultat explique que les bactéries sont isolées à partir des appareils racinaires des deux légumineuses (nos échantillons), de *Cicer arietinum* (*Mesorhizobium* sp.), de *Hedysarum coronarium* (*Rhizobium sullae*) et de *Trifolium* (*R.l. bv trifolii*).

La résistance intrinsèque aux métaux lourds testés et aux concentrations choisies montre la seule inhibition par le Cadmium, exceptés *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* et *Mesorhizium* sp aux fortes concentrations de Cd. On note un polymorphisme de croissance des souches et isolats sur le mercure. La recherche de la C.M.I. (concentration minimale inhibitrice) n'est pas décelée dans les concentrations choisies des métaux lourds pris en considération. Toutefois une CMI apparaît chez le Cd (à la plus faible concentration, 100µg/ml, l'ensemble des bactéries sont inhibées.

La croissance des souches et isolats en milieu liquide est mesurée en présence de métaux lourds non toxiques (Cu et Zn) et métaux lourds toxiques (Cd, Pb et Hg). Dans l'ensemble la concentration du métal influence la croissance bactérienne, que ce soit en présence de métaux toxiques ou non toxiques.

En comparant la croissance bactérienne en absence et en présence de métaux lourds, on note une différence du comportement des souches bactériennes. Une particularité apparaît dans la croissance des souches, l'isolat VF3 (isolée de *Vicia faba*) en présence de Plomb, et *Rhizobium sullae* (isolée de *Hedysarum coronarium*) en présence de Mercure. Apparemment ceci s'explique qu'il y a une adaptation de la souche au métal, avec une solubilisation du

métal dans la cellule. De ce fait la cellule bactérienne montre une certaine résistance à certains métaux lourds toxiques (cas de VF3 et *R. sultae*).

Ce travail mériterait d'être approfondi, par exemple en étudiant l'effet du stress des métaux lourds sur les cellules bactériennes, par un profil SDS-PAGE des protéines cellulaires, par une analyse protéomique et si possible une analyse transcriptomique (Maynaud, 2012).

## ANNEXE 1

### Les milieux des cultures

#### **Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970) en g/l**

Mannitol	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g
L'eau distillé	1000ml
pH	6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

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

YMB	1000ml
Agar	15 g
pH	6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes

#### **Tryptone-Yeast (TY) (Beringer, 1974) g/l**

Tryptone	5.0 g
Extrait de levure	3.0 g
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0.87 g
L'eau distillé	1000 ml
pH	6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

### **YMA + Rouge congou en g/l**

YMB	1000ml
Solution stock de rouge congou	10ml
Agar	15g
pH	6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

### **YMA+bleu de bromothymol (BTB)**

YMA	990ml
Solution stock de BTB	10ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

### **Milieu Muller Hinton**

Infusion de viande de bœuf	300,0 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17,0
pH	7,4

### **Milieu YMA+ CaCO<sub>3</sub>**

YMB	1000ml
Agar	15 g
pH	6.8
CaCO <sub>3</sub>	3g/l

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.



**Tryptone-Yeast (TY) (Beringer, 1974) g/l contenant 0.1% KNO<sub>3</sub>**

Tryptone	5.0 g
Extrait de levure	3.0 g
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0.87 g
KNO <sub>3</sub>	0.1%
L'eau distillé	1000 ml
pH	6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes

## ANNEXE 2

Mesure de la 600 de l'isolat p en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,014	0,043	0,062	0,218	0,17	0,135	0,028	0,02	0,032	0,017
<b>2</b>	0,174	0,202	0,174	0,24	0,285	0,11	0,19	0,178	0,23	0,099
<b>4</b>	0,266	0,312	0,22	0,243	0,298	0,165	0,383	0,245	0,246	0,112
<b>26</b>	0,413	0,39	0,467	0,285	0,76	0,275	0,38	0,278	0,392	0,25
<b>28</b>	0,428	0,393	0,63	0,3	0,756	0,294	0,385	0,288	0,384	0,383
<b>30</b>	0,415	0,38	0,665	0,37	0,662	0,492	0,398	0,288	0,641	0,432
<b>32</b>	0,319	0,315	0,685	0,23	0,613	0,429	0,42	0,32	0,705	0,57
<b>34</b>	0,185	0,259	0,692	0,229	0,58	0,232	0,425	0,323	0,713	0,578
<b>36</b>	0,223	0,	0,692	0,22	0,525	0,23	0,424	0,322	0,715	0,584

Mesure de la DO 600 de l'isolat VF1 en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,045	0,023	0,202	0,057	0,126	0,05	0,187	0,087	0,058	0,046
<b>2</b>	0,216	0,121	0,263	0,066	0,129	0,111	0,326	0,27	0,06	0,052
<b>4</b>	0,406	0,406	0,341	0,114	0,163	0,14	0,578	0,359	0,177	0,097
<b>26</b>	0,412	0,35	0,305	0,122	0,257	0,245	0,6	0,512	0,283	0,152
<b>28</b>	0,406	0,256	0,3	0,126	0,298	0,239	0,59	0,502	0,285	0,158
<b>30</b>	0,39	0,169	0,288	0,179	0,247	0,227	0,585	0,453	0,285	0,16
<b>32</b>	0,315	0,149	0,278	0,161	0,19	0,201	0,57	0,311	0,175	0,101
<b>34</b>	0,14	0,135	0,196	0,135	0,177	0,19	0,501	0,245	0,12	0,08
<b>36</b>	0,122	0,099	0,17	0,12	0,17	0,182	0,427	0,223	0,102	0,075

Mesure de la DO 600 de l'isolat VF2 en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,045	0,023	0,054	0,042	0,098	0,052	0,18	0,013	0,043	0,031
<b>2</b>	0,216	0,121	0,126	0,088	0,19	0,143	0,198	0,107	0,216	0,05
<b>4</b>	0,406	0,211	0,356	0,124	0,327	0,212	0,283	0,145	0,38	0,086
<b>26</b>	0,412	0,385	0,38	0,215	0,49	0,356	0,28	0,223	0,306	0,254
<b>28</b>	0,39	0,355	0,278	0,23	0,485	0,352	0,26	0,212	0,284	0,243
<b>30</b>	0,336	0,32	0,23	0,202	0,477	0,344	0,245	0,184	0,272	0,214
<b>32</b>	0,302	0,269	0,205	0,124	0,448	0,298	0,201	0,123	0,255	0,2
<b>34</b>	0,225	0,167	0,19	0,051	0,201	0,17	0,1	0,045	0,193	0,141
<b>36</b>	0,214	0,132	0,185	0,045	0,152	0,133	0,08	0,015	0,116	0,1

Mesure de la DO 600 de l'isolat VF3 en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,119	0,092	0,054	0,021	0,282	0,136	0,092	0,211	0,024	0,054
<b>2</b>	0,239	0,206	0,22	0,165	0,35	0,176	0,296	0,286	0,101	0,188
<b>4</b>	0,406	0,4	0,382	0,371	0,605	0,198	0,506	0,495	0,319	0,432
<b>26</b>	0,509	0,489	0,524	0,469	0,634	0,304	0,568	0,582	0,432	0,513
<b>28</b>	0,703	0,398	0,576	0,597	0,636	0,586	0,727	0,704	0,626	0,679
<b>30</b>	0,85	0,363	0,782	0,749	0,862	0,692	0,731	0,818	0,786	0,722
<b>32</b>	0,854	0,345	0,639	0,688	0,761	0,522	0,641	0,719	0,656	0,585
<b>34</b>	0,85	0,34	0,538	0,433	0,423	0,378	0,48	0,662	0,525	0,479
<b>36</b>	0,849	0,323	0,526	0,423	0,42	0,377	0,412	0,6	0,514	0,412

Mesure de la DO 600 de *Rhizobium sllae* en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,155	0,152	0,294	0,305	0,015	0,29	0,098	0,198	0,25	0,082
<b>2</b>	0,181	0,177	0,34	0,345	0,17	0,31	0,198	0,229	0,315	0,143
<b>4</b>	0,185	0,151	0,386	0,39	0,224	0,342	0,235	0,317	0,405	0,2
<b>26</b>	0,854	0,8	0,294	0,871	0,887	0,852	0,502	0,85	0,647	0,826
<b>28</b>	0,902	0,821	0,34	1,1	0,89	0,966	0,525	0,865	1,076	0,84
<b>30</b>	0,903	0,823	0,386	0,95	0,909	0,97	0,578	0,884	1,078	0,877
<b>32</b>	0,832	0,852	0,294	0,94	0,963	0,955	0,612	0,129	1,081	0,84
<b>34</b>	0,82	0,854	0,34	0,92	0,962	0,937	0,615	0,032	1,085	0,832
<b>36</b>	0,860	0,812	0,386	0,91	0,962	0,93	0,614	0,046	1,078	0,815

Mesure de la DO 600 de *Mesorhizobium sp.* en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,179	0,132	0,244	0,15	0,169	0,209	0,158	0,153	0,306	0,245
<b>2</b>	0,194	0,121	0,255	0,224	0,2	0,229	0,217	0,215	0,313	0,23
<b>4</b>	0,209	0,145	0,304	0,255	0,325	0,248	0,256	0,218	0,32	0,186
<b>26</b>	0,425	0,388	0,334	0,269	0,416	0,582	0,362	0,281	0,601	0,465
<b>28</b>	0,43	0,365	0,374	0,28	0,32	0,573	0,386	0,32	0,608	0,536
<b>30</b>	0,426	0,336	0,302	0,36	0,305	0,56	0,391	0,38	0,653	0,547
<b>32</b>	0,409	0,332	0,295	0,307	0,26	0,54	0,401	0,39	0,622	0,592
<b>34</b>	0,398	0,325	0,281	0,298	0,252	0,525	0,412	0,407	0,612	0,564
<b>36</b>	0,378	0,312	0,278	0,271	0,505	0,236	0,418	0,42	0,609	0,545

Mesure de la DO 600 de *R.leguminosarum* bv. *trifolii* 843 en présence des métaux

métal Temps (H)	Zn (µg/ml)		Pb (µg/ml)		Cd (µg/ml)		Hg (µg/ml)		Cu (µg/ml)	
	1500	2000	2500	3000	50	100	20	50	1000	2000
<b>0</b>	0,076	0,093	0,091	0,234	0,015	0,098	0,147	0,12	0,125	0,173
<b>2</b>	0,285	0,27	0,366	0,417	0,179	0,267	0,178	0,16	0,285	0,34
<b>4</b>	0,582	0,56	0,666	0,677	0,242	0,35	0,213	0,202	0,318	0,365
<b>26</b>	0,666	0,678	0,765	0,668	0,543	0,587	0,38	0,255	0,642	0,628
<b>28</b>	0,933	0,864	1,071	1,138	0,612	0,64	0,427	0,325	0,725	0,652
<b>30</b>	0,915	0,857	1,088	1,144	0,741	0,716	0,475	0,372	0,984	0,946
<b>32</b>	0,87	0,851	1,038	1,105	0,823	0,922	0,491	0,375	0,977	0,954
<b>34</b>	0,663	0,547	0,121	0,216	0,805	0,932	0,512	0,397	1,025	1,003
<b>36</b>	0,645	0,532	0,091	0,234	0,909	0,767	0,537	0,312	0,53	0,34

Mesure de la DO de l'isolat p en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.190	0.312	0.306	0.704	0.730	0.733	0.791	0.810	0.824

Mesure de la DO de l'isolat VF1 en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.078	0.171	0.399	0.757	0.795	0.760	0.530	0.328	<b>0.202</b>

Mesure de la DO de l'isolat VF2 en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.082	0.126	0.356	0.690	0.721	0.645	0.443	0.282	0.215

Mesure de la DO de l'isolat VF3 en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.05	0.229	0.525	0.746	0.782	0.648	0.420	0.303	0.201

Mesure de la DO de *Rhizobium sllae* en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.1	0.216	0.404	0.835	0.852	0.820	0.698	0.685	0.664

Mesure de la DO de *Mesorhizobium sp.* en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.112	0.282	0.452	0.613	0.814	0.879	0.903	0.932	0.956

Mesure de la DO de *R.leguminosarum* bv. *Trifolli* 843 en absence des métaux

Temps(H)	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>
DO	0.103	0.434	0.660	1.019	1.035	1.048	1.112	1.164	1.170

**Adriano D.C. (2001).** In: Trace Metals in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, Springer-Verlag, New York, pp. 866 Second ed.

**Angle S. J., Chaudri A. M., McGrath S. P., Chaney R. L. et Giller K. E. (1993).** Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* **25 (5):** 575-580.

**Alvarez-Martínez ER, Valverde A, Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Tejedor C, Mateos PF, Santillana N, Zuniga D, Peix A, Velazquez E. (2009).** The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Archives of microbiology.* 191: 659–668.

**Anonyme :** [gepotany.newneglandwild.org](http://gepotany.newneglandwild.org).

**Anonyme:** [www.agroatlas.ru](http://www.agroatlas.ru).

**Baize, D. (1997).** Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, p 408.

**Baker, A.J.M. and Walker, P.L. (1989).** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC Press, 155-177.

**Beck,D.P; Materon, L.A; Afondi, F., (1993).** Practical *Rhizobium* –Legume Technology Manual Technical Manual N°19.ICARDRA Box 5466, Aleppo,Syria.

**Bourelleier, P.H. and Berthelin, J. (1998).** Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. CR. AccSci, 42. Ed. Lavoisier, Paris.

**Brink M et Belay G. (2006).** Ressources végétales de l’Afrique tropicale : céréales et légumes secs. Wageningen, Pays-Bas : PROTA. pp 171-177. ISBN 90-5782-172-9.

- Cieslarová J, Smýkal P, Dockalová Z, Hanáček P, Prochazka S, Hýbl M, Griga M. (2011).** Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Genetic Resources and Crop Evolution*.**58**: 439–451.
- Claire. F. (2012).** Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg.
- Cooper JE. (2007).** Early interactions between legumes and *Rhizobia*: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*.**103**: 1355–1365.
- Cooper JE. (2004).** Multiple responses of *Rhizobia* to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*. **41**: 1–62.
- Cullimore JV, Ranjeva R et Bono JJ. (2001).** Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*. **6**: 24-30.
- Chaudri A M., McGrath S. P. et Giller K. E. (1993).** Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with metalcontaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem*. **25(3)**: 301-3093.
- Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C. (2001).** Nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*.Mini.review.**48** (2): 359 – 365.
- Denarie J., Debelle F. (1996).** *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochemis*.**65** : 503 - 35.
- Doyle JJ. (2011).** Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Molecular Plant- Microbe Interactions*. **24**: 1289–1295.
- Doyle JJ, Luckow MA. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900–10.



**Dahlin S., Witter E., Martensson A. M., Turner A. et Baath E. (1997).** Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal Contamination. *Soil Biol. Biochem.* **29 (9)**: 1405-1415.

**Diaz-Ravina M., Baath E. et Frostegard A. (1994).** Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **60 (7)**: 2238-2247.

**Evans LT. (1959).** Environmental Control of Flowering in *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* **23(4)**:521-546.

**Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Colin, C., Santos, A.D., and Escarré, J. (2006).** Specific interaction between local metalicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil* **282**: 53-65.

**Gadd, G.M. (1992).** Metals and microorganisms - a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 197-203.

**Gage D. J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68(2)**: 280 – 300.

**Gallais A, Bannerot H. (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et Critères de sélection. Paris: INRA.

**Graham P. H., Sadowsky M. J., Keyser H. H., Barnet Y. M., Bradley R. S., Cooper J. E., et al. (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem- nodulating bacteria. *Int. J. sys.bacteriol.* **41(4)**. p : 582 – 587.

**Godin, P. M., Feinberg, M.H. & Ducauze, C.J. (1985).** Modelling of soil contamination by Airborne lead and cadmium around several emission sources. *Environ. pollut.* **10**, 97-114.

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

**Guignard J.L., Dupont F. (2005).** Botanique. 13ème Edition Masson.

**Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire.DUNOD. Paris.

**Giller,K .E.,W itter,E ., McGrath,S .P.( 1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389-1414

**Harrison SP, Young JPW, Jones DG. (1987).** *Rhizobium* population genetics: effect of clover variety and inoculum dilution on the genetic diversity sampled from natural populations. *Plant Soil*. 103: 147–150.

**Haukka k., Lindstrom K., Young P.W. (1998).** Three Phylogenetic Groups of nodA and nifH Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from *Leguminous Trees Growing* in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol. Rev.* **64** (2): 419 – 426.

**Jordan D.C. (1984).** *Rhizobiaceae*. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N. R., Holt J. G. Vol: 1. Ed. Williams and Wilkins. ISBN. 10: 0-387-24145-0. Baltimore. pp. 234 – 245

**Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001).** Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.

**Lewis G, Schrire B, MacKinder B, Lock M. (2005).** Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.

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

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

**Loué, A. (1993).** Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.

**Maynaud, G. (2012).** Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II.

**Michel, A. (2009).** Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. Université de Reims.

**Messiaen C.M et Messiaen-Parotto F. (2009).** Les légumineuses. In Le potager familial méditerranéen : Guide pratique. Quae.pp 100-111. ISBN: 1952-2770.

**Martensson A. M. et Witter E. (1990).** Influence of various soil amendments on nitrogen-fixing soil micro-organisms in long-term field experiment, with special reference to sewage sludge. Soil Biol. Biochem. **22** (7): 977-982.

**Martensson A. M. (1992).** Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. Soil Biol. Biochem. **24** (5): 435-445.

**McGrath S. P., Brookes P.C. et Giller K. E. (1988).** Effects of potentially toxic elements in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. Soil Biol. Biochem. **20**: 415-424.

**Pier-Anne, B. (2009).** Etude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. Et sa symbiose avec l'aulne noir (*Alnus Glutinosa* (L.) Gaertn). Thèse de Doctorat. Université de Sherbrooke.

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

**Rosenberg C. (1997).** Signaux symbiotiques chez *Rhizobium*. Chapitre 8. pp : 149 - 161. In : Gudry J. F. M. Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologique, biochimique. Ed. INRA. Paris. ISBN: 2-7380-0716-3. 419 p.

**Robert, M. and Juste, C. (1999).** Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.

**Rother J.A., Millbant J.W., et Thornton T. (1983).** Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens L.*) in grasslands on soil contaminated with cadmium, lead and zinc. *J. Soil Sei.* **34**: 127-136.

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

**Soussou, S. (2013).** Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques de *Hedysarum coronarium*. Thèse de Doctorat. Université de Sousse.

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

**Somasegaran P., Hoben H.J. (1994).** Hand book for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450.

**Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P. (1998).** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology.* 84(1) pp 81-89. Supporting bacteria *Current Science*, Vol. 89, N°1.

**Terefework Z. (2002).** *Diversity and Phylogeny of Rhizobium galegae, and reflections on molecular evolution of Rhizobium-legume symbiosis.* Department of Applied Chemistry and Microbiology. Université Helsinki. 52 p.

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

**Udvardi MK, Tabata S, Parniske Met Stougaard J. (2005).** *Lotus japonicus*: legume Research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* **10**: 222-228.

**Vincent, J.M., (1970)** .A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

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

**Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O. (2009).** Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Journal.* **57**: 171–183.