



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم: الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité: Ecologie Microbienne

Intitulé :

**Etude de l'antagonisme entre certaines espèces du
Mesorhizobium nodulaires et leur effet sur l'alimentation
phosphaté et sur l'amélioration de tolérance pour Zinc du
pois chiche**

Présenté et soutenu par : BOUAMAMA MERIEM

Le : 14/06/2016

HARCHA HANANE

Jury d'évaluation :

Président du jury: Mme.GUERGOURI I. (M.A.A - UFM Constantine).

Rapporteur : Mlle.DEKKICHE S (Université Hadj Lakhdar Batna).

Examineurs : M.CHABBI R (M.A.A-UFM Constantine)

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements:

Nos tenons à remercier infiniment **Melle Dekkiche Samia** enseignante de l'Université Hadj Lakhdar à Batna pour l'orientation et confiance. Sans le quel ce travail n'aurait pas pu mener ou bon port et pour son aide tout au long de notre période de travail.

Nos remerciement à **Mme Guergouri Ibtissem** pour son accord d'accepter de présider notre travail.

Nous remercions **M. Chabbi Rabah** de nous faire l'honneur de juger ce modeste travail.

Nos tenons à exprimer nos remerciement à l'équipe de laboratoire de Biotechnologie:

Liala;Raja;Marwa;rayen;Zahra;Iness;Nihed;Hadjer;Houda;Lina;Rahil;Meriem;Wafa;Loubna Housseem; Doudou;Adem;Oussama;Issam pour leur aide.

Un grand merci à **M.laaraba Djamel; M.Benhizia Yassine; M.boufrioa Ammar** pour laide et surtout leur gentillesse.

Dédicace

Je dédie ce mémoire.....

qui m'a dotée de la volonté et de la patience de compléter ce travail au représentant d'Allah premièrement qui
le fruit de nos efforts.

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

A ma mère Zerdazie Karima symbole d'amour et de sacrifices qui m'a toujours poussée et
encouragée pour étudier

A mon père Nacer pour sa grande compréhension et sa confiance et pour son aide inoubliable

Je dois également exprimer toute ma gratitude envers mon frère et mon fiancé

A mon frère Mouhamed

A mon fiancé Passilo

A mes Binômes HARCHA HANANE

à mes chères amies: Nardjess; Hanane; Rima; Sara; Loubna

à mes tantes et à ma grand-mère

à toutes les personnes que j'aime

BOUAMAMA MERIEM

Dédicace

*Avant de dédier ce travail, je tiens à remercier الله Tout
Puissant qui nous a permis de mener à bien ce
modeste travail*

A mes très chers parents Dejaefare et Salima Zerguine

A mes frères Walid Mohamad et Mouloud

A ma sœur Souad

A ma binôme Meriem

A toute la famille HARCHA et Zerguine

A mes chère amis: Loulou; Nardjasse; Hadjer

A tous mes collègues de ma promotion

HARCHA Hanane

Liste des Figures:

Figure1: partie d'une racinaire d'une légumineuse avec nodosités.....	4
Figure2: Différents étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse.....	5
Figure3: les types de cultivars, feuille et fleur du pois chiche (Maheri et al; 2008).....	11
Figure4: Description du pois chiche (Singh et Diwakar;1995).....	13
Figure 5: Etapes du test de l'antagonisme des bactéries.....	19
Figure 6: Test de solubilisation du phosphate par les bactéries.....	20
Figure7 : Etapes de stérilisation des graines.....	21
Figure 8: Stérilisation des pots pour la culture du pois chiche.....	22
Figure9 : Etapes du semi inoculation et co-inoculation des graines.....	24
Figure10: Etapes du test de tolérance des bactéries au zinc.....	25
Figure11: Etapes du test de tolérance du <i>Cicer aritinum</i> au Zinc.....	27
Figure12: Etapes d'inoculation et de co-inoculation des graines.....	28
Figure13: aspect des colonies sur YMA+Rouge Congo.....	30
Figure14: résultats du test d'antagonisme des souches bactériennes.....	31
Figure15 : Aspect des graines stériles germées.....	35
Figure 16: Aspect des plantes témoins non inoculées.....	36
Figure 17: Aspect des plantes inoculées.....	38
Figure18: Effet bactérien sur la croissance du pois chiche.....	40
Figure19: Tolérance de <i>Mesorhizobium</i> aux différentes concentrations de Zinc sur milieu TY.....	43
Figure20 : aspect des colonies des souches en présence du zinc sur milieu TY (0,7%).....	45
Figure21 : Effet du Zinc sur <i>Cicer arietinum</i>	47
Figure22: Effet de l'inoculation et la Co-inoculation sur la tolérance au zinc chez <i>Cicer arietinum</i> en culture hydroponique.....	49
Figure23 : effet des bactéries et le Zinc sur la croissance du pois chiche.....	51

Listes des tableau

Tableau 1: le rendement de pois chiche en Algérie (2010-2014) (FAOSTAT. 2014).....	14
Tableau2: les différentes espèces du <i>Mesorhizobium</i> (Laranjo et al, 2014).....	15
Tableau3 : Bactéries utilisées.....	17
Tableau 4: Traitements utilisés pour examiner la mobilisation du phosphate.....	23
Tableau 5: Traitements réalisés dans l'inoculation et la co-inoculation de <i>Cicer arietinum</i> en présence de sa CMI en zinc.....	25
Tableau6: résultats d'antagonisme entre les souches bactériennes.....	32
Tableau7 : Croissance et solubilisation bactérienne du phosphate.....	33
Tableau8 : Mobilisation bactérienne du phosphate sur la croissance du pois chiche.....	39
Tableau9: Tolérance au Zinc des souches et diamètre des colonies sur les concentrations de 1,25 et 3,5mM.....	44
Tableau10 : mobilité des souches bactérienne en présence du Zinc, sur le milieu TY semi solide.....	46
Tableau11 : Paramètres de croissance du pois chiche en présence de la CMI en Zinc et des bactéries.....	50

Résumé

Cette étude vise à examiner trois souches (B1, B2 et B3), nodulaires du pois chiche (*Cicer arietinum*), pour leur activités biologiques concernant la solubilisation du phosphate, la tolérance pour le Zinc in vitro ainsi que d'évaluer l'effet de ces capacités sur la croissance du pois chiche. Le critère de sélection des souches In vitro pour le cas de solubilisation de phosphate, était basé sur le diamètre de l'halot entourant les colonies sur le milieu YAD supplémenté de Triple Super Phosphate (TSP) et sur l'absence et la présence des colonies sur milieu TY supplémenté par différentes concentrations de Zinc, dans le cas de tolérance au Zinc. L'inoculation et la co inoculation bactérienne du pois chiche, sont réalisés sur pots de sable dans le cas de phosphate et sur culture hydroponique pour le cas du Zinc. Les résultats montrent que In vitro, B2 est la plus solubilisante du phosphate alors que B1 est la plus intéressante pour la tolérance au Zinc. L'inoculation et la co inoculation bactérienne du pois chiche ont permis de classer selon leur fiabilité dans la solubilisation du phosphate les inoculums en B1, B2, B3 comme inoculum simple et B1+B2, B1+B3, B2+B3, B1+B2+B3 comme inoculum mixte. L'effet des différents inoculums est trouvé non significatif dans le cas d'amélioration de tolérance du pois chiche au Zinc. Ainsi les résultats sont promoteurs pour le cas de solubilisation du phosphate et permettent de classer nos bactéries parmi les PGPR (Plant Growth Promouvoir Rhizobacteria). Un test avec une concentration en Zinc, située entre la CMI du pois chiche et 400 µM permettrait de vérifier l'effet de nos bactéries sur le pois chiche pour améliorer sa tolérance en Zinc.

Mots clés : *Mesorhizobium* ; *Cicer arietinum* ; phosphate ; Zinc ; inoculation

Abstract:

This study aims

at examining three stocks (B1, B2 and B3), nodular of chickpea (*Cicer arietinum*), for their biological activities concerning the solubilization of phosphate, the tolerance for in vitro Zinc like evaluating the effect of these capacities on the growth of chickpea. The selection criteria of the In vitro stocks in the case of phosphate solubilization were based on the diameter of the halo surrounding the colonies on supplemented medium YAD of Super Triple Phosphates (TSP) and on the absence and the presence of the colonies on medium TY supplemented by various Zinc concentrations, in the case of tolerance with Zinc. The inoculation and Co bacterial inoculation of chickpea, are carried out on pots of sand in the case of phosphate and hydroponic culture for the case of Zinc. The results show that In vitro, B2 is more solubilizing phosphate whereas B1 is most interesting for the tolerance with Zinc. The inoculation and Co bacterial inoculation of chickpea made it possible to classify according to their reliability in solubilization of phosphate. The inoculums in B1, B2, simple B3 like inoculum and B1+B2, B1+B3, B2+B3, mixed B1+B2+B3 like inoculum.

The effect of different the inoculums is found nonsignificant in the case of improvement of tolerance of chickpea to Zinc. Thus the results are promoters in the case of solubilization of phosphate and make it possible to classify our bacteria among the PGPR (Growth Seedling Topromote Rhizobacteria). A test with a Zinc concentration, located between the CMI of chickpea and 400 µM would make it possible to check the effect of our bacteria on chickpea to improve its Zinc tolerance.

Keywords: *Mesorhizobium*; *Cicer arietinum*; phosphate; Zinc; inoculation

الملخص

تهدف هذه الدراسة الى فحص (ب₂: ب₁: ب₃) سلالات عقيدية الحمص من أجل نشاطاتها البيولوجية الخاصة بتدوير الفوسفات و تحمل الزنك في المختبر و كذلك تقييم تأثير قدراتها على نمو الحمص معيار اختيار هذه السلالات في المختبر لحالة تدوير الفوسفات كان على أساس قطر الهالة التي تحيط بالمستعمرات في الوسط YAD المضاف اليه ثلاثي عالي الفوسفات (TSP) في غياب حضور المستعمرات. في الوسط TY المضاف اليه تراكيز مختلفة من الزنك؛ في حالة تحمل الزنك الحقن و الحقن المشترك البكتيري للحمص يحقق في قدور (Pots) بها رمل في حالة الفوسفات و وسط مائي (hydroponique) في حالة الزنك. تبين النتائج في المختبر أن ب₂ هي الأكثر اذابة للفوسفات بينما ب₁ هي الأكثر أهمية في تحمل الزنك. الحقن و الحقن المشترك البكتيري للحمص سمحوا لنا بترتيب ب₁؛ ب₂؛ ب₃ مثل حقن بسيط و ب₁+ب₂؛ ب₁+ب₃؛ ب₂+ب₃ ب₁+ب₂+ب₃ مثل حقن مشترك في ذوبان الفوسفات. تأثير مختلف الحقن وجد بدون أهمية في حالة تحسين تحمل الحمص للزنك؛ و هكذا النتائج و اعدة من أجل تدوير الفوسفات و السماح بترتيب هذه البكتيريا من بين PGPR. امتحان مع تركيز في الزنك الموجود بين التركيز المنخفض المثبط سمي للحمص و 400µM تسمح بالتحقق من تأثير هذه البكتيريا على الحمص من أجل تحسين تحملها للزنك

Mots clés : *Mesorhizobium* ; *Cicer arietinum* ; phosphate ; Zinc ; inoculation

SOMMAIRE:

Liste des figures

Liste Tableaux

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction:.....1

Chapitre I : Etude bibliographique

I –Symbiose légumineuse- rhizobium4

1-Généralités.....4

2-Les partenaires de la symbiose.....6

2-1-Les légumineuses : Macro symbiote.....6

2-2-Les rhizobiums : micro symbiotes.....7

3-Intérêt agronomique et économique de la symbiose8

3-1-Exploitation des bactéries fixatrices d’azote.....8

3-2-Exploitation des activités PGPR bactériennes autres que la fixation
d’azote.....8

3-2-1-Cas des bactéries solubitrices du phosphate9

3-2-2-Cas des bactéries résistante.....9

II-Les symbiotes de cette étude10

1-le pois chiche (*Cicer arietinum*)10

1-1-Origine.....11

1-2-Type de cultivars11

1-3-Classification Botanique13

1-4-Caractères morphologiques et physiologique du pois chiche13

1-5-Importance alimentaire et économique.....	13
1-6-Situation du pois chiche en Algérie.....	14
2-Le rhizobium nodulant le pois chiche.....	15

Chapitre II : Matériel et Méthode

I - Sources et outils utilisés.....	17
1 - Outil végétale	17
2 -Outil bactérien.....	17
2-1 - les bactéries testées.....	17
2-2 - Réactivation, purification, repiquage des souches.....	17
2-3- Préparation des cultures bactériennes (inoculum).....	17
3 - Support et substrat de la culture végétale.....	18
II - Etude de l'antagonisme chez les souches bactériennes.....	18
1-Préparation des suspensions bactériennes.....	18
2-Contacte et antagonisme entre bactéries	18
III- Etude de solubilisation de phosphate naturel par les bactéries.....	20
1-Capacité de solubilisation.....	20
2-Mobilisation bactérienne de la solubilisation du phosphate chez la plante <i>Cicer aritinum</i>	21
2-1-Stérilisation germination des graines	21
2-2-dispositifs en pots et condition de culture des plantes.....	22
2-2-1Stérilisation des pots et du sable	22
2-2-2-Semi et mise en culture.....	23
2-3-Valorisation de l'effet de solubilisateur du phosphate de la bactérie sur la plante.....	24
IV-Etude de tolérance en zinc.....	25
1-Bactéries <i>Mesorhizobium</i> et tolérance au zinc	25

1-1-Effet du zinc sur la viabilité bactérienne.....	25
1-2-Effet sur la mobilité	26
2-Tolérance de <i>Cicer arietinum</i>	26
2-1-Culture et traitement.....	26
2-2 Détermination la CMI.....	27
3-Effetde l'inoculation et la Co-inoculation sur la tolérance au zinc chez <i>Cicer aritinum</i> ...	27
V-Analyses statistiques	29

Chapitre III : Résultats et Discussion

I-Vérification des caractères morphologique et culturaux des souches utilisées	30
1-Croissance des isolats sur le milieu solide (YMA+RC).....	30
1-Croissance des souches sur le milieu liquide(YMB).....	30
II- Test d'antagonisme entre les souches bactériennes	31
III- solubilisation du phosphate	33
1-la capacité de solubilisation bactérienne sur le milieu YAD	33
2-Mobilisation bactérienne de la solubilisation du phosphate chez la plante <i>Cicer aritinum</i>	34
2-1-Teste de germination.....	34
2-2-plantes obtenus suite au teste d'immobilisation du phosphate.....	36
2-2-1-Absence et présence du phosphate soluble.....	36
2-2-2-Inoculation et Co-inoculation (mobilisation bactérienne du phosphate).....	37
VI-Etude de tolérance en zinc	42
1-Test de tolérance des bactéries au zinc.....	42
1-1-La concertation minimale inhibitrice (CMI).....	42
1-2-Mobilité bactérienne.....	45
2-Tolérance au Zinc du pois chiche.....	47

3-Effet de l'inoculation et Co-inoculation sur la tolérance en Zinc du pois chiche.....	48
Conclusion.....	53
Perspectives.....	54
Référence bibliographiques	
Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

Vue son importance dans le développement économique et social et son impact sur l'environnement, le domaine de l'agriculture demeure parmi les secteurs les plus pertinents contribuant à résoudre le problème du besoin nutritionnel face à celui de la croissance démographique. Afin d'améliorer la qualité et le rendement des produits agricoles et de mettre en place des stratégies permettant d'atteindre les objectifs escomptés, plusieurs efforts ont été déployés, cependant les avancées réalisées notamment grâce à l'utilisation abusive des engrais chimiques ont entraînés des problèmes graves, comme la pollution environnementale et les risques sanitaires.

Aujourd'hui, et grâce à des associations de microorganismes bénéfiques du sol, on a la possibilité d'avoir un apport d'éléments nutritifs assimilables par les plantes (Lagrange, 2010). A titre d'exemple la symbiose rhizobia-légumineuse fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle des engrais synthétisés par voie chimique, et joue donc un rôle écologique et économique considérable. Les rhizobias sont considérés à juste titre comme de bons inoculums ou biofertilisants qui permettent la croissance des légumineuses. Par ailleurs, la mise en évidence de l'existence d'une diversité de bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), ouvre la porte devant les chercheurs scientifiques pour mettre au point des formulations de produits biofertilisants, efficaces et économiques permettant de mieux gérer les éléments nécessaires à la croissance des plantes.

En raison de leur nature sensible, plusieurs plantes se montrent incapables de s'adapter à leur environnement changeant d'où leur régression en rendement. Ces changements se manifestent par une panoplie de stress biotiques et abiotiques notamment l'indisponibilité d'une quantité suffisante en phosphate soluble et la toxicité par les métaux lourds.

Le phosphore est un élément nutritif essentiel qui est ajouté au sol sous forme de phosphates inorganiques, sous forme libre dans le sol, il joue un rôle central dans la nutrition des plantes (Scheffer et Schachtschabel, 1992). Une grande partie de ces phosphates utilisés comme engrais est immobilisée après application et devient indisponible pour les plantes (Dey, 1988; Singh et Kapoor, 1994), bien que d'autres caractéristiques du sol jouent également un rôle dans la solubilité du phosphore appliquée (pH, C dans le sol, etc.). D'après les résultats obtenus par Scheffer et Schachtschabel (1992) seulement 0,1% du phosphore total à partir du sol est disponible pour les plantes. En dehors de la fertilisation et de la

décomposition microbienne enzymatique de composés organiques, la mobilisation du phosphore serait peut-être le seul moyen possible d'augmenter le phosphore disponible pour les plantes (Illmer et Schinner, 1992). Ainsi, l'inoculation d'un sol avec des microorganismes capables de solubiliser le phosphate pourrait résoudre ce problème (Halder et al., 1990; Illmer et al., 1995).

Aussi, les microorganismes en tant qu'associés aux plantes ou bien en tant que bactéries libres du sol, capables de catalyser des réactions de mobilisation ou immobilisation des métaux lourds, permettent l'amélioration de l'accumulation des métaux lourds par celles-ci. Cette caractéristique leur permet de jouer un rôle important dans le processus de Bio remédiation. Cette dernière étant définie comme étant une technologie respectueuse de l'environnement dont le but principal réside dans l'atténuation de la pollution des écosystèmes tel que le sol et l'eau.

Le pois chiche est une parmi les plus importantes légumineuses, dont le prix relativement élevé, a stimulé l'accroissement de sa production dans le monde. En Algérie malgré l'augmentation des surfaces cultivées en cette légumineuse, son rendement reste insuffisant aux besoins du pays. La résolution des causes agro techniques de ce problème est en cours mais les solutions biologiques telles que l'examen et la caractérisation des microorganismes associés à cette plante, ainsi que leur exploitation, sont faiblement discutées.

La solubilisation des phosphates a été trouvée dans plusieurs espèces de rhizobiums qui nodulent différentes légumineuses, mais les espèces (*M.cicer* et *M.mediterraneum*) nodulant le pois chiches sont les solubilisants les plus puissants du phosphate (Halder et al., 1990, Peix et al., 2001). Parmi les souches nodulaires du pois chiches isolées dans un travail antérieur, nous avons identifié trois espèces différentes génétiquement des deux espèces (*M.cicer* et *M.mediterraneum*). L'examen des activités biologiques de ces trois souches serait un outil pour en déduire leur rôle au sein du nodule du pois chiche et l'exploiter dans l'augmentation du rendement en pois chiche.

Ce travail de Master s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche portant sur le rôle des bactéries nodulaires des légumineuses (BNL).

Le but principal était de déterminer pour la première fois plusieurs points concernant une variété de pois chiche d'hiver adaptée aux conditions édapho-climatiques du site de Jijel et concernant trois souches nodulaires de cette plante isolées dans un travail antérieur. Ces souches sont différentes génétiquement des deux espèces spécifiques du pois chiche (*M.ciceri* et *M. mediterraneum*). Les points d'étude peuvent être résumés en :

-Examinations de l'antagonisme entre les trois souches nodulaires

-Détermination de la capacité de solubilisation du phosphate naturel par ces bactéries *invitro* ainsi que la détermination de leur capacité de mobilisation du phosphate dans le pois chiche. Dans les deux cas l'inoculum bactérien testé, est soit simple, soit mixte (combinaison de deux ou trois bactéries).

- Détermination du profil de tolérance au zinc pour la plante ainsi que pour chacune des bactéries nodulaires. Ce point concerne aussi l'examinations de l'effet d'inoculation et de la co-inoculation par ces bactéries sur la tolérance du pois chiche au zinc.

CHAPITRE I:

Etude bibliographique

I-Symbiose légumineuses- rhizobiums

1-Generalités

La symbiose légumineuses- rhizobias est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi aux rhizobias pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote atmosphérique qui sera assimilé par la plante hôte (Raven et *al.*, 2000).

Grâce à cette symbiose une importante économie d'engrais azotés peut être réalisée. A titre d'exemple, au Brésil l'inoculation du soja (*glycine max L.*) aux champs fournit jusqu'à 300 kg de N/ha, ce qui entraîne des économies d'engrais azotés estimés à 3 milliards de dollars (Santos et *al.*, 2006).

L'interaction symbiotique entre les bactéries rhizobias et les plantes de la famille des légumineuses se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac (Perry et *al.*, 2004).



Figure1: Partie d'une racinaire d'une légumineuse avec nodosités

La nodulation est un phénomène complexe, elle est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo *et al.*, 2008; Lohar *et al.*, 2009). En présence des rhizobias, la plante émet des signaux par la production de flavonoïdes qui stimulent la sécrétion des facteurs *Nod* par les rhizobias (D'Haese et Holsters, 2002) (figure2).

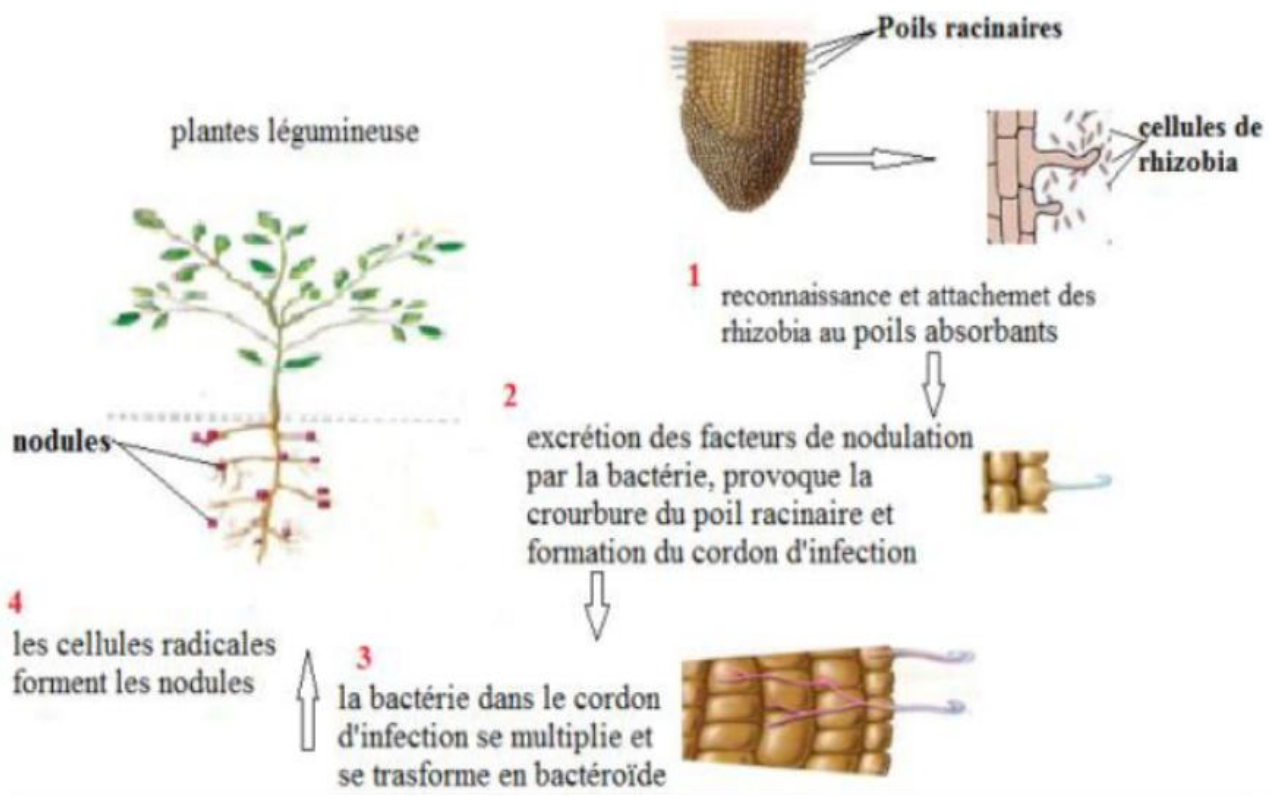


Figure2: Différents étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse

La symbiose légumineuse – rhizobium est très spécifique, un rhizobium donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient à son spectre d'hôte. Les amplitudes des spectres des légumineuses et des rhizobias sont très variables, en effet, on trouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et col., 1988), alors que cette même légumineuse possède d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*.) (Boivin *et al.*, 1997).

En général, cette spécificité symbiotique est en relation avec la composition des exsudats racinaires qui est intimement liée à l'espèce, rendant la rhizosphère plus spécifique et favorable à ses partenaires symbiotiques (Sharma et *al.*, 2004). Cette spécificité serait contrôlée par les lectines de l'hôte qui reconnaissent certains glucides des parois bactériennes (Larpen, 1985; Marie et *al.*, 2001; Deakin et Broughton 2009). Les lipopolysaccharides sont des composés minoritaires de la membrane bactérienne externe qui jouent aussi un rôle important dans la spécificité rhizobias- légumineuses (Jones et *al.*, 2007).

2-Les partenaires de la symbiose

2-1-Les légumineuses : Macrosymbiote

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les Angiospermes, Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*), avec 727 genres et près de 20000 espèces (Cronk et *al.*, 2006). Les espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd et *al.*, 2001). Les formes arborescentes sont prédominantes dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont., 2005). Cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinioideae*) (Guignard et Dupont., 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven et *al.*, 2000 ;Loynachan., 2003). Deux groupes de légumineuses peuvent être distingués:

*les légumineuses fourragères (trèfle;luzerne;sainfoin.....) consommées soit directement par pâturage des prairies; soit récoltées sous forme de fourrage.

*les légumineuses cultivées. Dans cette catégorie on distingue encore les espèces à graines riches en protéines et en huiles,sans amidon classées comme oléagineux (soja; arachide;.....)et les espèces a graines riche en protéines classées comme protéagineux (pois; fève) ou légumes sec (haricot; lentille; pois chiche) (Zhu et *al.*,2005).

Les légumineuses sont riches en constituants alimentaires (vitamines, fibre alimentaires, glucides complexes, protéines) et renferment très peu et souvent aucun acide gras. La richesse des légumineuses en protéines permet de corriger dans une certaine mesure les carences en protéines animales, ainsi que le déséquilibre alimentaire des populations qui ont tendance à se nourrir exclusivement de céréales.Selon (Obaton., 1980) un hectare de légumineuses

alimentaires produit un tonne de protéines, soit 10 fois plus qu'une production d'un élevage à viande sur la même surface. Dans les régions semi-arides du bassin méditerranéen où les ressources en eau sont en constante régression, les agriculteurs se rendent compte, de plus en plus, du rôle appréciable que jouent les légumineuses à graines dans la fertilisation organique du sol, surtout, dans le système de l'agriculture durable (Pacucci et al., 2006).

Bien qu'elle ait bénéficié de quelques programmes de développement, la production de ces cultures en Algérie n'a pas connu l'évolution, alors que la demande de consommation ne cesse d'augmenter, d'où le recours systématique à l'importation.

2-2- Les rhizobiums : Micro-symbiotes:

Le nom rhizobium concerne les bactéries fixatrices d'azote en symbiose dans des nodules formées au niveau des racines des légumineuses. Les rhizobiums, sont des bactéries mobiles, Gram négatif, aérobies et non sporulantes (Jordan., 1984). Le milieu le plus utilisé pour la culture des rhizobiums est le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar), contenant des sels minéraux, du sucre, de l'extrait de levure et de l'agar (Vincent., 1970 ; Somasegaran et Hoben., 1994). Sur ce milieu, les souches apparaissent au bout de 3 à 7 jours après incubation à 25-30°C. Les colonies ont une forme circulaire, convexe de 2 à 4 mm de diamètre (Somasegaran et Hoben., 1994). Dans le sol ces bactéries sont sous forme de bâtonnets de taille moyenne (0,5 - 0,9 µ de largeur et 1,2 - 3 µ de longueur) (Jordan., 1984).

La majorité des rhizobiums isolés jusqu'à présent appartient au groupe des *alpha-Proteobacteria* (l'un des 25 phylums bactériens et sans doute l'un des plus importants, il comporte 387 genres qui se répartissent en 5 branches phylogénétiques), à la famille des *Rhizobiaceae* qui comprend divers genres dont les plus connues sont: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* et *Bradyrhizobium*. Depuis 2001, des bactéries n'appartenant pas à cette sous classe ont été isolées de nodosités de légumineuses, notamment le genre *Burkholderia* (MOULIN & al., 2001), qui fait partie de la sous classe des β -proteobactéries. Plusieurs nouveaux genres et espèces de rhizobia ont été décrits ces dernières années tels que les genres: *Cupriavidus* (CHEN & al., 2003), *Devosia* (RIVAS & al., 2002), *Ochrobactrum lupini* (TRUJILLO & al., 2005), *Phyllobacterium trifolii* (VALVERDE & al., 2005).

3-Interet agronomique et économique de la symbiose

3-1-Exploitation des bactéries fixatrices d'azote

L'utilisation des inoculant de rhizobium dans les graines de légumineuses est peut-être l'application biotechnologique la plus agro ancienne (Lindström et *al.*, 2010). Les rhizobiums sont symbiotes bactériens de légumineuses qui fixent l'azote atmosphérique dans un processus connu sous le nom de la fixation biologique de l'azote (BNF). Ce sont d'excellents exemples de bactéries capables de fournir un macro nutriment (azote), aux plantes du sol. Grâce à ce type de symbiose, une importante économie d'engrais azotés peut être réalisée. A titre d'exemple, au Brésil l'inoculation du soja (*Glycine max L.*) aux champs fournit jusqu'à 300 kg N/ha, ce qui entraîne des économies d'engrais azotés estimées à 3 milliards de dollars (Santos et *al.*, 2006).

La résultante BNF des symbioses rhizobium-légumineuses peut bénéficier non seulement de la culture hôte, mais aussi, peut avoir des effets positifs pour les cultures subséquentes (Lupwayiet *al.*, 2004). En outre, le rhizobium peut également agir comme PGPR non-symbiotique comme dans le cas des cultures non-légumineuses économiquement importantes telles que le riz ou le blé, qui sont les exemples les mieux étudiés et qui bénéficient de rhizobiums endophytes (Biswas et *al.*, 2000; Chaintreuil et *al.*, 2000). Pour toutes ces raisons, la symbiose rhizobium-légumineuse a été largement étudiée comme modèle des associations mutualistes et comme une association bénéfique pour une agriculture durable.

3-2- Exploitation des activités PGPR bactériennes autres que la fixation d'azote

Parmi les microorganismes du sol, certains à effet PGPR (plant growth promoting bacteria) ont la particularité d'améliorer la croissance des plantes directement ou indirectement (Khan et *al.*, 2009). Les PGPR sont des bactéries qui rentrent en symbiose associative avec la plante, sans différenciation morphologique des deux partenaires. La rhizosphère est leur habitat privilégié, même si certaines souches sont capables de coloniser l'intérieur des plantes (endophytes). Au niveau de la rhizosphère, ces bactéries vont pouvoir bénéficier des rhizodépôts relargués par la plante. En revanche, les PGPR vont avoir un effet bénéfique et stimulateur de la croissance des plantes qui sont leurs associés. Cet effet peut permettre de classer la plupart des PGPR en deux groupes (Bashan et Holguin., 1998) :

* Les PGPR phytoprotectrices, qui ont un effet de protection des plantes donc indirectement de leur croissance.

* Les PGPR phytostimulatrices, qui stimulent directement la croissance racinaire via la stimulation directe qui consiste à fournir des éléments nutritifs pour la plante. Parmi ces éléments, figurent : (i) l'azote à travers l'activité des nitrates réductases; (ii) les phytohormones (tels que l'acide indole acétique, la zéatine, l'acide gibbérellique et l'acide abscissique); (iii) le fer séquestré par les sidérophores bactériens; et (iv) le phosphore à travers la solubilisation d'acides organiques (Zaidi et *al.*, 2009). La distinction entre ces deux groupes fonctionnels n'est cependant pas toujours nette, et certaines PGPR peuvent appartenir aux deux groupes.

3-2-1-Cas des bactéries solubitrices du phosphate

Le phosphore est le deuxième nutriment après l'azote limitant la croissance des plantes terrestres). La disponibilité de cet élément dans le sol est grandement améliorée par la production microbienne de métabolites conduisant à l'abaissement de pH et la libération de phosphate soluble à partir des complexes organiques et inorganiques (Haque et Dave 2005). En outre, quelques souches ou espèces de rhizobium sont impliqués dans la solubilisation du phosphate aussi [Deshwal VK et Maheshwari DK 2003]. Toutefois, des études sur l'aptitude de souches de rhizobium à solubiliser le phosphate sont très limitées (Halder Ak et Chakrabarty PK 1990).

3-2-2- Cas des bactéries résistantes au Zinc:

Les sites miniers sont des lieux potentiellement très délétères provoquant une forte réduction de la diversité végétale et microbienne. Toutefois, la sensibilité ou la tolérance des plantes et des micro-organismes non adaptés à ces sites envers les métaux reste variable et dépend de l'espèce et du génotype, cependant la tolérance aux métaux est plus importante chez micro-organismes telles que les bactéries. La phytotoxicité des métaux peut s'exprimer par des altérations de nombreux processus physiologiques au niveau cellulaire et/ou moléculaire chez les plantes et les micro-organismes. La dénaturation et l'inactivation des enzymes, le blocage des groupes fonctionnels de molécules métaboliquement importantes, le déplacement ou le remplacement d'éléments essentiels perturbent l'intégrité des membranes et des cellules. (Ross et Kaye, 1994 ; Rascio et NavariIzzo, 2011).

Le Zinc est l'un des constituants, les plus importants des métaux existants dans les sites miniers. Ce métal est connu pour être un inhibiteur puissant des systèmes de transport d'électrons chez les micro-organismes. Certaines bactéries libres ou symbiotiques sont connues par leur tolérance à ce métal. Leur résistance à des niveaux toxiques de Zinc peut être due à l'accumulation et un stockage extracellulaire, (Blencowe et Morby, 2003; Choudhury et Srivastava, 2001). Le système d'efflux est un mécanisme important impliqué dans la résistance au Zinc. Il réalise le transport actif des ions métalliques via plusieurs protéines. Les protéines de transport qui sont responsables du transport du zinc à travers la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram négatif sont les « Cation Diffusion Facilitator » (CDF), les « Resistance Nodulation cell Division » (RND), ainsi que les P-types ATPases. Bien que le transport de Zinc par les P- types ATPases se fasse à travers la membrane cytoplasmique après hydrolyse de l'ATP, les systèmes RND sont capables de transporter le Zn à travers la paroi cellulaire complète des bactéries (Choudhury et Srivastava, 2001; Silver et Phung, 2005). Cette capacité de résistance fait de ces bactéries un outil pour décontaminer les sols et améliorer la tolérance et l'adaptation des plantes sensibles. En effet certaines bactéries saprophytes et symbiotiques sont capables d'améliorer de façon directe le processus de phytoremédiation en modifiant la biodisponibilité des métaux par changement du pH du sol, la sécrétion des chélateurs (acides organiques et sidérophores) ou par des réactions d'oxydoréduction (Ma *et al.*, 2011). Les champignons mycorhiziens contribuent à leur tour dans la tolérance aux métaux et ont été également connus pour leur rôle dans la promotion de la croissance des plantes hyper accumulatrices (Zarei *et al.*, 2010).

II-Les symbiotes de cette étude

1-Le pois chiche (*Cicer arietinum*):

Le pois chiche (*Cicer arietinum*.L.) est une plante de la famille des *Fabacées* (ou légumineuse); voisine du petit pois mais d'un genre botanique différent. Son nom latin d'espèce *arietinum* fait référence à la forme de la graine en tête de bélier (aries). Ses principaux constituants sont les lipides; les substances azotées; l'amidon; les sucres; les sels minéraux (phosphore; potassium; magnésium; calcium; sodium; silice) ; l'oxyde de fer; de l'arsenic de l'asparagine; et les vitamines B et C (ENCARTA., 2005)

1-1- Origine

Le pois chiche est probablement originaire du Proche-Orient (Sud est de la Turquie ;Syrie) ou' troisespèces annuelles sauvages de pois chiche existent encore dans cette région. On dit souventque le pois chiche a conquis l'Europe durant le moyen âge après que les croisés l'eurent redécouvert au Proche-Orient ;mais sa culture et sa consommation sont en réalité attestées bien avant; au moins dès le IX^e siècle en passantd'abord par l'Afghanistan(Kechach;2005)

1-2- Type de cultivars

L'espèce *Cicer aritinum* manifeste une grande variabilité phénotypique et génotypique. En général, Deux typesde pois chiche se distinguent: le type "Kabuli" et le type "Desi".Le premier originaire de Kabul, estlargement rependudans le monde et occupait en1981, 12.5% de la superficie mondial du pois chiche (Singh *etal*; 1983).C'est le seul type cultivé dans le bassin méditerranéen (Jimenez-Diaz et *al* 1988).La collection des lignées de ce type, maintenue à l'ICARDA, est désignées par les préfixe ILC (Reddy et Singh.,1984).Leurs graines de couleur crème sont de dimensions variables : petites, moyenneset grandes (Singh et *al.*, 1987).Le deuxième type "Desi" est utilisé en Inde, se distingue du premier par la couleur jaune, noir ou rouge de sessemences (Malhotra et *al.*, 1987).La collection de ces lignées maintenue, à l'ICRISAT estdésignée par lepréfixe ICC (Vander Maessen; 1987) (figure3).

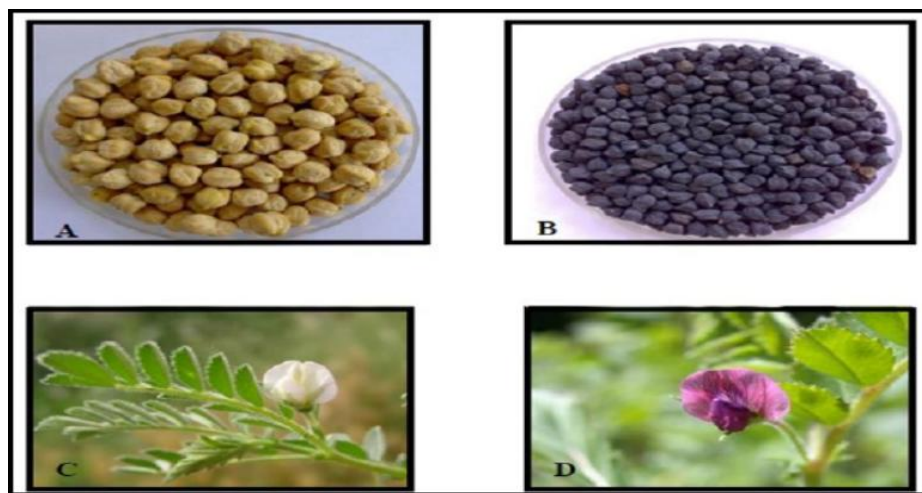


Figure3: les types de cultivars, feuille et fleur du pois chiche (Maheri et al; 2008)

A: pois chiche de type Kabuli ; B: pois chiche de type Desi ; C: fleur type Kabuli D:fleur de type Desi

1-3- classification Botanique

Regne:Plantae

Sous-règne:Tracheobionta

Division:Magnoliophyta

Classe:Magnoliopsida

Sous-classe:Rosidae

Ordre:Fabale

Famille:Fabaceae

Genre:Cicer

Nom binominal:*Cicer aritinum*L

1-4- Caractères morphologiques et physiologiques du pois chiche

Le pois chiche est une espèce diploïde avec $2n=16$ chromosomes. C'est une plante annuelle autogame avec une taille de 30 à 80 cm selon la variété. La tige est anguleuse d'une hauteur de 20 cm à 1m la tige principale porte généralement deux branches primaires ainsi que deux ramifications secondaires. Les feuilles sont alternes imparipennées; chaque feuille compte 10 à 15 folioles, ovales dentées et recouvertes de poils (Allali et al 2007). Les fleurs sont habituellement solitaires à l'aisselle de feuille, bisexuée, blanches, verdâtre, rose ou violacées, disposées en grappes caractérisées par leur aspect de papillons. Le fruit est une gousse globuleuse, contenant une ou deux graines (Bejiga et Van Der Maesen 2007). Le système racinaire est pivotant bien développée pourra atteindre jusqu'à plus d'un mètre de profondeur (Allali et al; 2007) (figure 4).

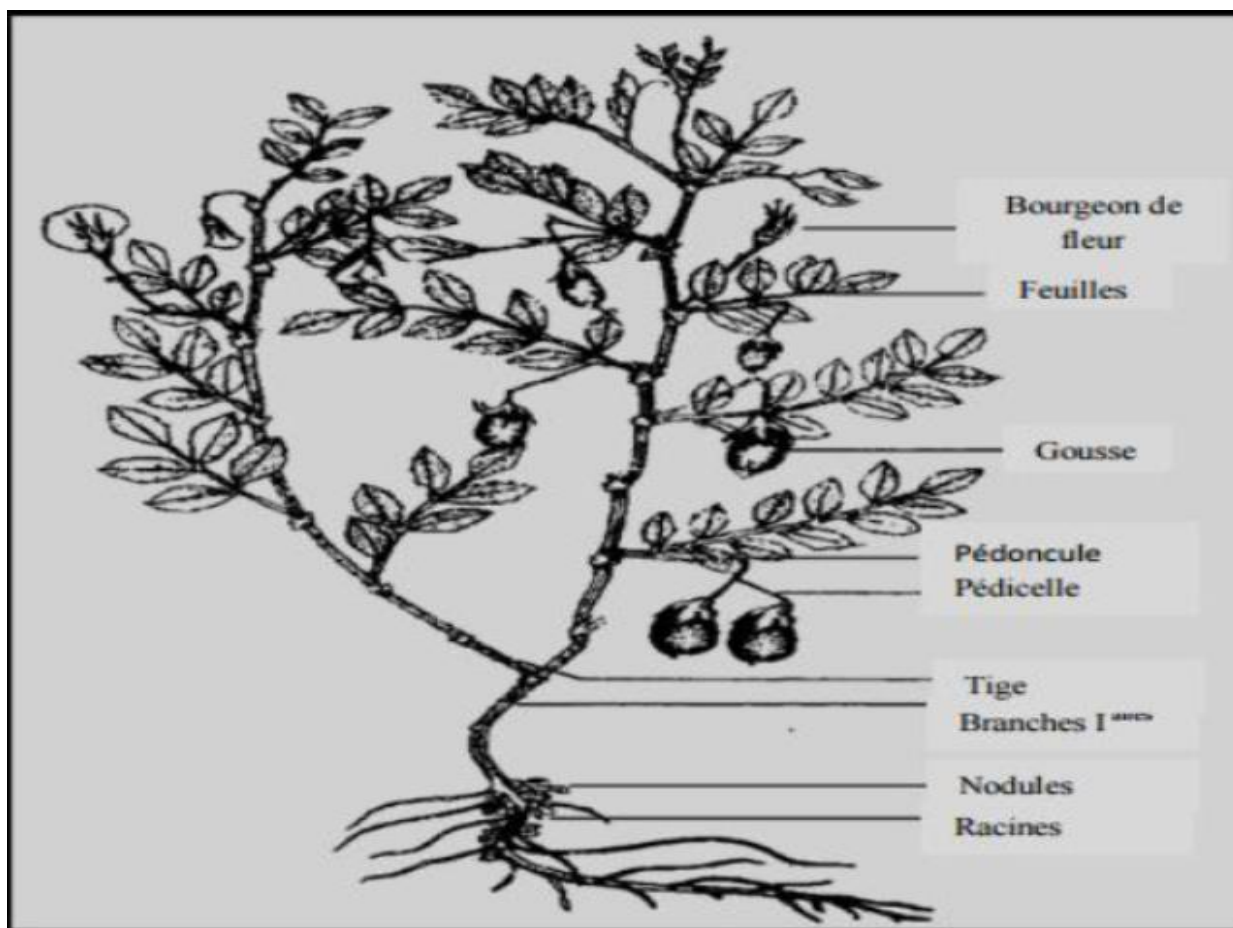


Figure4: Description du pois chiche (Singh et Diwakar;1995)

1-5-Importance alimentaire et économique

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*), est un aliment de base (Berger et al., 2003). Il a une composition alimentaire très riche en protéines digestibles et contient une fraction lipidique qui renferme des acides gras saturés tels que les acides linoléiques et oléiques. D'autant plus, il est réputé comme plante médicinale pour ses vertus cosmétiques et diététiques, (Slim et al., 2006). A travers le monde, le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est l'une des plus importantes légumineuses à graines. Il occupe la troisième position dans la famille des légumineuses après le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et le pois (*Pisum sativum L.*), (FAO.2007).

Le pois chiche est cultivé sur une large gamme de zones bioclimatiques qui s'étendent du subtropical, l'Inde et le Nord-est de l'Australie, aux zones arides et semi-arides des régions du bassin méditerranéen et de l'Australie Méridionale (Pacucci et al., 2006). Cette légumineuse peut fixer, par voie symbiotique, plus de 140 kg/ha d'azote atmosphérique et satisfaire plus de 80% de ses besoins en azote (Pacucci et al., 2006). En raison des importantes

quantités d'azote, incorporées dans le sol et délaissées dans les résidus, la culture du pois chiche maintient, pour une longue durée, la fertilité du sol et entre dans le système d'agriculture durable (ICRISAT. 2008).

1-6 -Situation du pois chiche en Algérie

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est, en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves. Bien que sa culture a connu, une certaine évolution progressive sur le plan des superficies et de la consommation, une évolution régressive en terme de productivité est connue au niveau de ce pays (tableau1).

Tableau 1: Le rendement de pois chiche en Algérie (2010-2014) (FAOSTAT. 2014)

Domain	Country	Element	Item	Year	Unit	Value	Flag	Flag Description
Cultures	Algérie	Rendement	Pois chiches	2010	Hg/Ha	9196.00	Fc	Donnée calculée
Cultures	Algérie	Rendement	Pois chiches	2011	Hg/Ha	8672.00	Fc	Donnée calculée
Cultures	Algérie	Rendement	Pois chiches	2012	Hg/Ha	9055.00	Fc	Donnée calculée
Cultures	Algérie	Rendement	Pois chiches	2013	Hg/Ha	11930.00	Fc	Donnée calculée
Cultures	Algérie	Rendement	Pois chiches	2014	Hg/Ha	10548.00	Fc	Donnée calculée

Les causes de cette faiblesse dans sa productivité sont souvent d'ordre agro techniques liées aux conditions de semis (période, modes de semis, qualité de la semence) et à l'infestation par les adventices (Hamadache et Ait Abdallah., 1998).

2- Le rhizobium nodulant le pois chiche:

Le rhizobium nodulant le pois chiche a d'abord été attribué à *Rhizobium ciceri* (Nour et al., 1994) et par la suite réaffecté dans le genre *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), qui est actuellement composé d'un total de 30 espèces (Tableau 2).

Tableau 2: Les différentes espèces du *Mesorhizobium* (Laranjo et al., 2014)

Species	Type strain	Original host legume	Reference	Accession numbers	
				16S rRNA gene	nodC
<i>M. abyssinicae</i>	AC98c ^T	<i>Acacia abyssinica/A. tortilis</i>	Degefu et al. (2013)	GQ847896	GQ848002
<i>M. albiziae</i>	CCBAU 61158 ^T	<i>Albizia kalkora</i>	Wang et al. (2007)	DQ100066	DQ311092
<i>M. alhagi</i>	CCNWXJ12-2 ^T	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al. (2010)	EU169578	EU722486
<i>M. amorphae</i>	ACCC 19665 ^T	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al. (1999)	AF041442	AF217261
<i>M. australicum</i>	WSM2073 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al. (2009)	AY601516	Mesau_05911
<i>M. camelthorni</i>	CCNWXJ 40-4 ^T	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al. (2011)	EU169581	EU722491
<i>M. caraganae</i>	CCBAU 11299 ^T	<i>Caragana microphylla</i>	Guan et al. (2008)	EF149003	EU130405
<i>M. chacoense</i>	LMG 19008 ^T	<i>Prosopis alba</i>	Velázquez et al. (2001)	AJ278249	DQ450937
<i>M. ciceri</i>	UPM-Ca ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al. (1994)	DQ444456	DQ450938
<i>M. gobiense</i>	CCBAU 83330 ^T	<i>Oxytropis glabra</i>	Han et al. (2008)	EF035064	EF050784
<i>M. hawassense</i>	AC99b ^T	<i>Sesbania sesban</i>	Degefu et al. (2013)	GQ847899	GQ848005
<i>M. huakuii</i>	CCBAU 260 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al. (1991)	D13431	*
<i>M. loti</i>	NZP 2213 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis et al. (1982)	X67229	DQ450939
<i>M. mediterraneum</i>	UPM-Ca3 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al. (1995)	L38825	DQ450940
<i>M. metallidurans</i>	STM 2683 ^T	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal et al. (2009)	AM930381	gi:496153723
<i>M. muleiense</i>	CCBAU 83963 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang et al. (2012)	HQ316710	HQ316752
<i>M. opportunistum</i>	WSM2075 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al. (2009)	AY601515	Mesop_6438
<i>M. plurifarium</i>	ORS 1032 ^T	<i>Acacia senegal</i>	de Lajudie et al. (1998)	Y14158	FJ745283
<i>M. qingshengii</i>	CCBAU 33460 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng et al. (2013)	JQ339788	JQ339881
<i>M. robiniae</i>	CCNWCY 115 ^T	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou et al. (2010)	EU849582	EU849563
<i>M. sangaii</i>	SCAU7 ^T	<i>Astragalus luteolus</i>	Zhou et al. (2013)	EU514525	JN129438
<i>M. septentrionale</i>	SDW014 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al. (2004)	AF508207	DQ450941
<i>M. shangrilense</i>	CCBAU 65327 ^T	<i>Caragana bicolor</i>	Lu et al. (2009)	EU074203	EU687487
<i>M. shonense</i>	AC39a ^T	<i>Acacia abyssinica</i>	Degefu et al. (2013)	GQ847890	GQ847995
<i>M. silamurunense</i>	CCBAU 01550 ^T	<i>Astragalus membranaceus</i>	Zhao et al. (2012)	EU399698	EU418404
<i>M. tamadayense</i>	Ala-3 ^T	<i>Anagyris latifolia</i>	Ramirez-Bahena et al. (2012)	AM491621	AM491624
<i>M. tarimense</i>	CCBAU 83306 ^T	<i>Lotus frondosus</i>	Han et al. (2008)	EF035058	EF050786
<i>M. temperatum</i>	SDW018 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al. (2004)	AF508208	DQ450942
<i>M. thioanganeticum</i>	SJT ^T	<i>(Clitoria ternatea)</i>	Ghosh and Roy (2006)	AJ864462	*
<i>M. tianshanense</i>	A-1BS ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Chen et al. (1995)	AF041447	DQ450943

Depuis lors, deux espèces ont été identifiées de façon récurrente dans diverses études: *M. Ciceri* et *M. mediterraneum* (Nour et al., 1995). Récemment six autres espèces (*M. amorphae*, *M. Loti*, *M. huakuii*, *M. opportunistum*, *M. muleiense* et *M. tianshanense*) ont été rapportés former des nodules fonctionnels sur les racines du pois chiches (Laranjo et al., 2004; Rivas et al 2007; Laranjo et al 2008; Alexandre et al 2009; Laranjo et al 2012; Zhang et al., 2012).

Ayant trouvé dans un travail antérieur, dans les nodules du pois chiche, des espèces qui sont non connues êtrespécifiques au pois chiche, notre but dans cette étude est de déterminer

le rôle de ces souches dans les nodules du pois chiche pour leurfuture exploitation dans une agriculture durable.

CHAPITRE II:

Matériel et Méthodes

I-Sources et outils utilisés

1-Outil végétal

Comme source végétale nous avons utilisé la variété Flip 90-13 du pois chiche (*Cicer aritinum L.*). Cette dernière est une variété d'hiver de type kabuli, elle nous a été fournie par le centre régional de l'institut National de la Recherche Agronomique de Constantine.

2-Outil bactérien

2-1-Bactéries testées

En vue de sélectionner des souches intéressantes destinées à l'inoculation et à l'amélioration du rendement du pois chiche; nous avons optés pour 3 souches isolées à partir des nodules de pois chiche (tableau1) qui ont déjà montré leur ineffectivité et leur effectivité pour le pois chiche dans un travail antérieure.

Tableau3 : Bactéries utilisées

Nom de la souche	Code de la souche	Affiliation par l'ARNr 16S de souche	Origine
Sam76	B1	<i>M.tarimense/M.gobiense</i>	Jijel
Sam80	B2	<i>M.opportunistum</i>	Jijel
Sam131	B3	<i>M.cicer/M.lotii</i>	Jijel

2-2-Réactivation, repiquage et purification des souches

Les souches en question ont été conservées après leurs purification à -80°C dans le glycérol 20%. Pour les réactiver, un repiquage des souches par striation est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YEM+RC modifié (Yeastextract mannitol) gélosé (VINCENT, 1970) (annexe). L'incubation est faite à 28°C pendant un jour ou sept (Sous agitation à 185rpm pour les cultures liquides).

2-3- Préparation des cultures bactériennes (inoculum)

Les pré-cultures et les cultures sont préparées à partir des colonies pures selon le protocole de Vincent (1970), soit dans des fioles ou des tubes à essai de milieu YEM liquide stérile. Elles sont incubées dans les conditions précises selon les tests appliqués. Dans tous les tests réalisés, l'inoculum n'est utilisé qu'après avoir atteint la phase exponentielle vérifiée par la densité optique ($DO \geq 0,5$ à 600nm).

3-Support et substrat de la culture végétale

Le support de culture végétale est constitué d'échantillons de sol de rivière. L'un est La culture végétale est alimentée par une solution nutritive (Solution de Fahreus un peu modifiée, Vincent ; 1970) contenant la majorité des sources nécessaires au développement du pois chiche (Annexe).

II-Etude de l'antagonisme chez les souches bactériennes

1-Préparation des suspensions bactériennes:

Une colonie de chaque souche à multiplier est introduite stérilement dans des fioles de 250 ml contenant 50 ml de milieu YEM liquide stérile. Le milieu YEM ainsi inoculé est disposé sur une table d'agitation à 28 C° et à 180 rpm pendant une durée qui dépend de la vitesse de croissance de souches (3jrs-5jrs). La suspension à utiliser doit être dans sa phase exponentielle.

2-Contacte et antagonisme entre bactéries:

Pour examiner l'antagonisme entre les 3 souches bactériennes, nous avons utilisé la méthode de la membrane de filtration effectuée en plusieurs étapes (figure 5).

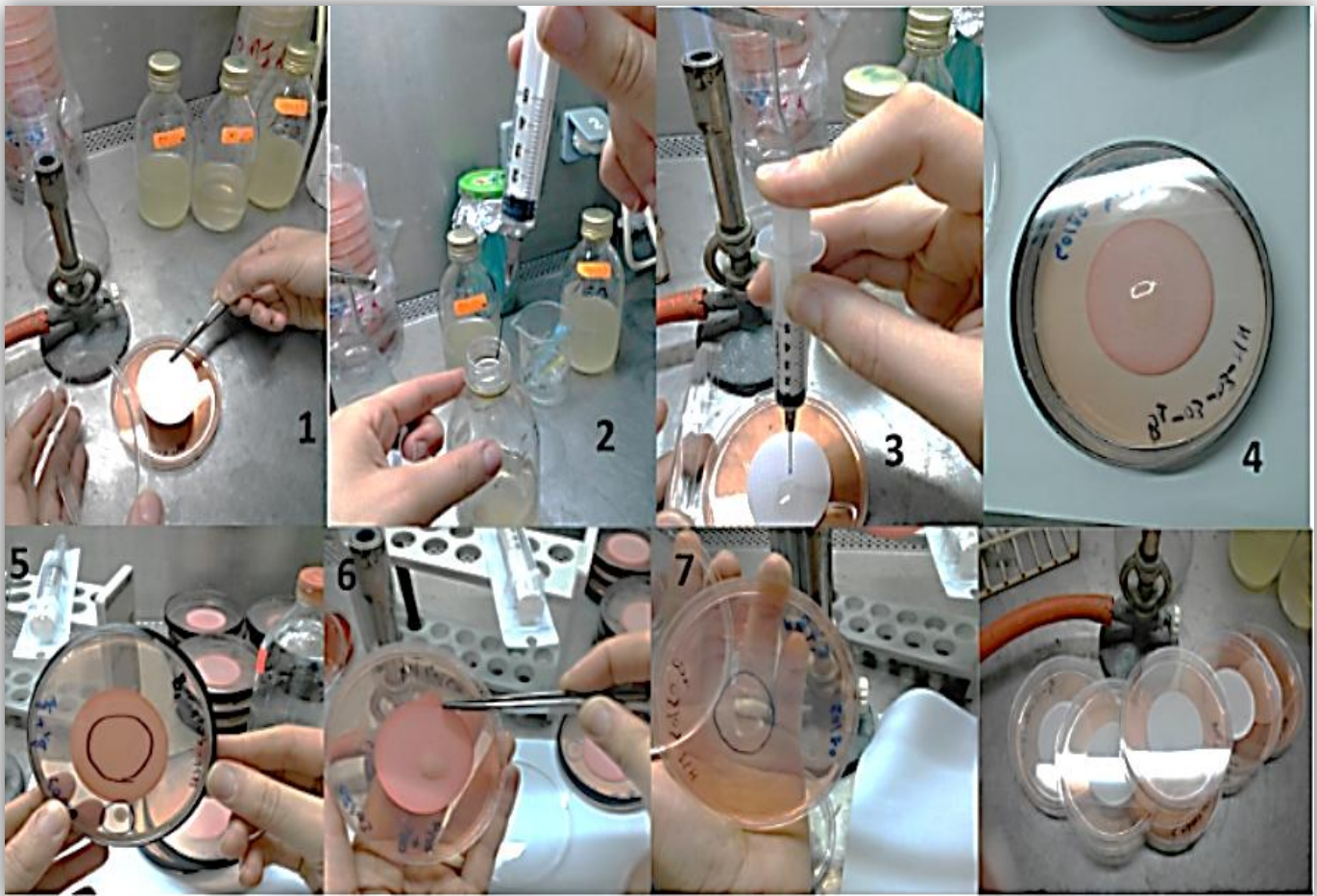


Figure 5: Etapes du test de l'antagonisme des bactéries

Des boîtes de milieu YEM solide, sont préparées et séchées sous hotte à flux laminaire. Des membranes de filtration de type Millipore(0.45) stériles sont délicatement déposées à l'aide d'une pince stérile sur le milieu de culture a raison d'une membrane par boîte. Au centre de la boîte et de la membrane, dix μl ($10\mu\text{l}$) de la suspension bactérienne à tester sont déposées et laissés sur place jusqu'à l'absorption totale de la goutte par la membrane. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 28C° pendant 5 jours. Après l'incubation; la membrane (avec la culture bactérienne dessus) est délicatement retirée de la surface du milieu de culture. La 2^{ème} suspension bactérienne, selon les 6 combinaisons à tester (B1-B2, B2-B1, B1-B3, B3-B1, B2-B3 et B3-B2) est pulvérisée au-dessus du milieu comme précédemment décrit. Les boîtes sont ré-incubées pour une période supplémentaire de 5 jours avant la lecture des résultats. Chaque cas de combinaison est répété par trois boîtes. La

tolérance de chacune des bactéries pour les exsudats des autres bactéries est en déduite par sa viabilité après leurs cultures.

III- Etude de solubilisation du phosphate naturel par les bactéries:

1-Capacité de solubilisation bactérienne

Les trois bactéries sont testées pour leur capacité à solubiliser le phosphate naturel sur le milieu YAD (Annexe) selon la technique de Rivas et al (2006). Les bactéries cultivées sur le YAD+ (contient KH_2PO_4) représentent les témoins positifs et celles cultivées sur le YAD- (ne contient aucune source du phosphate) représentent les témoins négatifs.

Plusieurs étapes sont réalisées (figure 6). Les suspensions bactériennes en phase exponentielle sont ensemencées à raison de $10\mu\text{l}$ au centre des boîtes de YAD par un râteau en verre stérile. Pour chaque souche, trois répétitions sont réalisées. Les boîtes sont incubées à 30C° pendant 3 à 7 jours.



Figure 6: Test de solubilisation du phosphate par les bactéries

La capacité de solubilisation des bactéries est montrée par l'apparition des zones claires autour des colonies. Après incubation. L'efficacité de solubilisation du phosphate

(PSE) des bactéries est représentée par le rapport entre le diamètre total de la zone claire y compris la croissance bactérienne (Z) et le diamètre de la colonie (C) multiplié par 100 :

$$\text{PSE}=(Z/C).100$$

2-Mobilisation bactérienne du phosphate chez la plante *Cicer-arietinum*

2-1-Stérilisation et germination des graines

Des graines de pois chiche sélectionnées pour leur uniformité ont subi plusieurs étapes pour être stérilisées selon la technique de Vincent (1970) avec quelques modifications (figure7). Ces dernières sont immergées pendant 5 min dans une solution d'hypo chlorure de sodium(5%), puis rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Au dernier rinçage, elles sont laissées gonfler pendant 12 heures à +4°C.



Figure7 : Etapes de stérilisation des graines

Les graines sont mises à germer durant 5 jours, à l'obscurité dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose molle (0,7%). Après l'apparition des radicelles, les graines seront utilisées pour le semis.

2-2-Dispositifs en pots et conditions de culture des plantes

L'évaluation de l'effet de l'inoculation et de la co-inoculation avec les rhizobactéries sélectionnées sur la croissance du pois chiche est réalisée selon la technique décrite par Rivas et al(2006). La culture de la plante est réalisée dans des pots en plastiques stériles de 250ml de volume. Ces pots étaient stériles, contenaient du sable stérile comme support et de la solution nutritive stérile.

2-2-1-Stérilisation des pots et du sable:

Les pots sont stérilisés sous l'hotte avec l'hypochlorure de sodium diluée (10%). Après son lavage plusieurs fois avec de l'eau de robinet, le sol est mis à sécher. Le sol sec est ensuite imbibé avec de l'eau distillée puis mis à autoclaver à 120°C pendant 20 min dans un récipient en le couvrant avec du papier aluminium (figure 8).

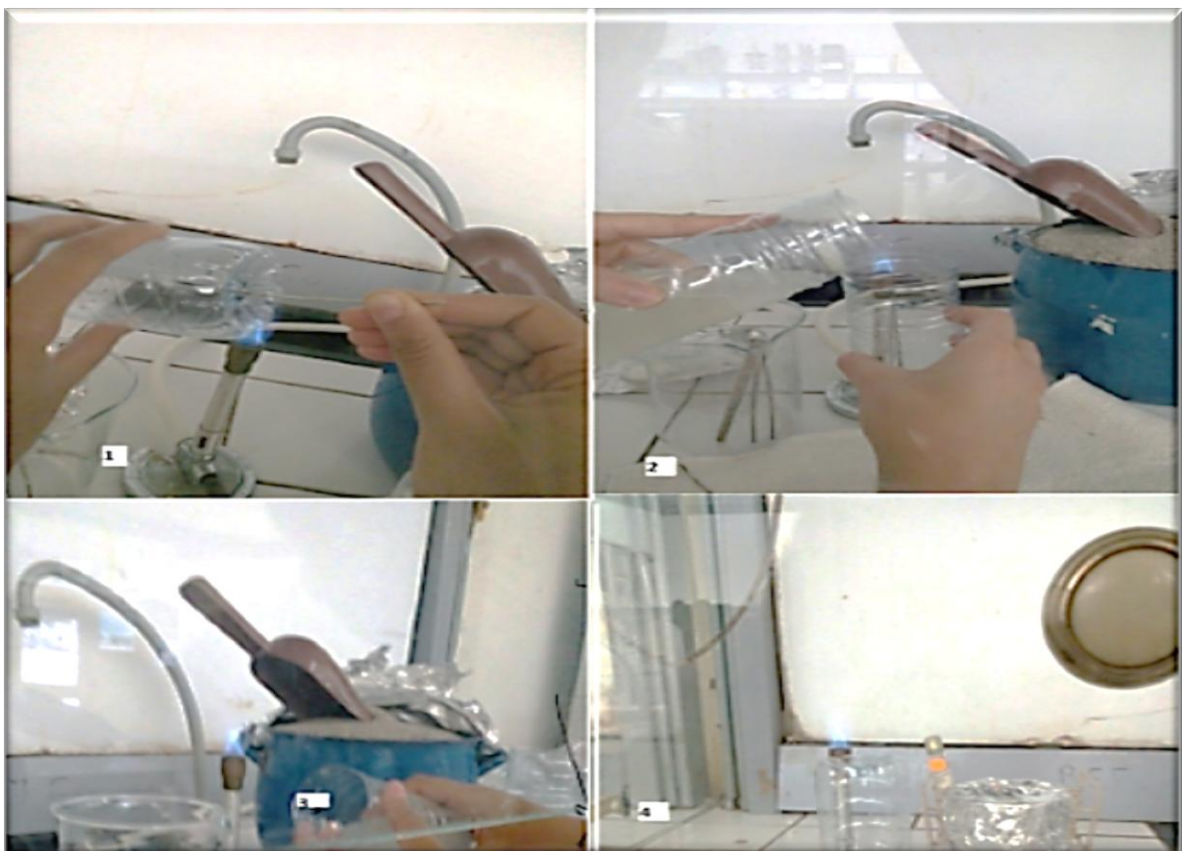


Figure 8: Stérilisation des pots pour la culture du pois chiche

2-2-2- Semi et mise en culture

Les graines pré germées sont semées au centre à raison de 1 par pot (figure9). Pour chaque traitement, chaque pot est inoculé avec 1 ml de la ou des suspension(s) bactérienne(s) en phase exponentielle. Le dispositif est ensuite placé dans la chambre de culture pendant 45 jours avec une photopériode lumière/obscurité de 16 h / 8 h et un cycle de température jour/nuit de 25°C / 18°C. Les plantes reçoivent régulièrement de la solution nutritive stérile à raison de 25 ml par pot, 1 fois chaque deux jour. 10 répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

Plusieurs traitements sont réalisés pour tester l'effet de la capacité de la mobilisation du phosphate dans le pois chiche (tableau4).

Tableau 4: Traitements utilisés pour examiner la mobilisation du phosphate

Traitements	Solutions nutritives	répétition	But
Témoin			
SN+N-P Sans inoculation	Avec azote sans P	10	TP ⁻ 1
SN+N+Pnaturel Sans inoculation	Avec azote et Pn	10	TP ²
SN+N-Plibre Sans inoculation	Avec azote et Plibre	10	TP ⁺
Inoculation Simple			
SN-N+B1	Sans azote (+Pn)	10	Solu Pn
SN-N+B2	Sans azote (+Pn)	10	Solu Pn
SN-N+B3	Sans azote (+Pn)	10	Solu Pn
Co-inoculation			
Co-inoculation (2 souches)			
SN-N+B1+B2	Sans azote (+Pn)	10	Solu Pn coino
SN-N+B1+B3	Sans azote (+Pn)	10	Solu Pnn coino
SN-N+B2+B3	Sans azote (+Pn)	10	Solu P coino
Co-inoculation(3 souches)			
SN-N+P+B1+B2+B3	Sans azote (+Pn)	10	Solu Pn coino

SN : solution nutritive ; N : Azote ; TP : Témoin en phosphate ; P : phosphate ; Pn : phosphate naturel ; Solu : solubilisation ; coino : co-inoculation.

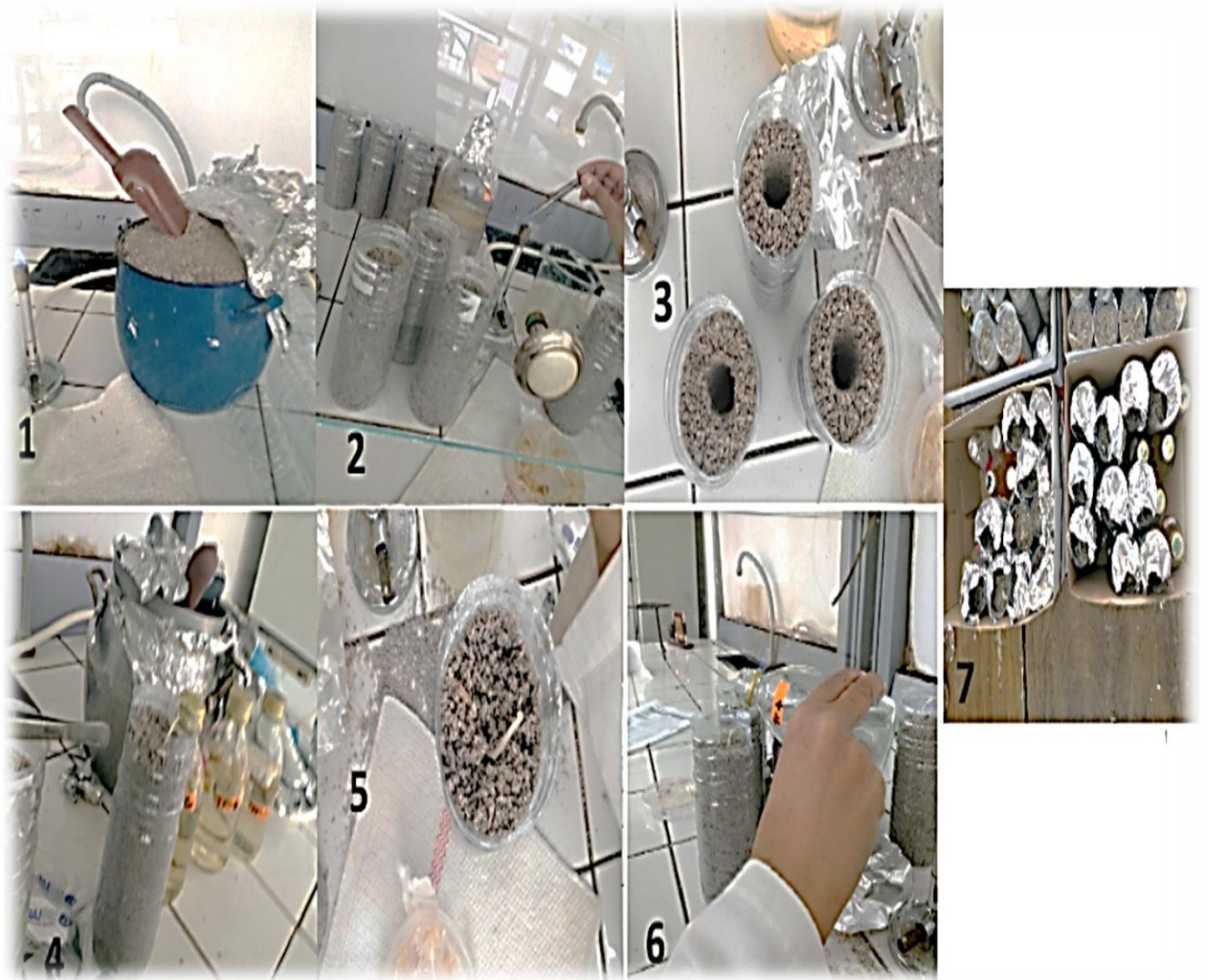


Figure9 : Etapes du semi inoculation et co-inoculation des graines

2-3-Valorisation de l'effet bactérien solubilisateur du phosphate sur la plante

L'effet bactérien solubilisateur du phosphate sur la croissance de la plante, est évalué par la mesure de quatre paramètres de croissance : La longueur de la partie aérienne ; Poids frais de la partie aérienne ; Longueur du système racinaire ; Poids frais du système racinaire.

VI-Etude de tolérance en zinc:

1-Bactéries *Mesorhizobium* et tolérance au zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$):

1-1-Effet du Zinc sur la viabilité bactérienne

La tolérance des bactéries au Zinc a été réalisée par la technique de dilution sur milieu solide (Chabbert., 1963). Cette tolérance est estimée par la croissance des souches et le diamètre des colonies formées sur le milieu de culture TY solide (Annexe) supplémenté de concentrations ascendantes en métaux allant de 5mM jusqu'à 30mM (1.25-3.5-5-10-15-20-25-30).

Les souches sont mises en culture liquide pendant 48h à 28°C. 10µl de la souche sont déposés sous forme de spot sur le milieu de culture TY solide. Chaque boîte de Pétri représentant une concentration est divisée en trois lots pour contenir 3 souches. Pour chaque concentration du Zinc 3 répétitions sont réalisées. Après incubation des boîtes pendant 3-5 jours à 28°C, les concentrations minimales inhibitrices « CMI » sont déterminées.

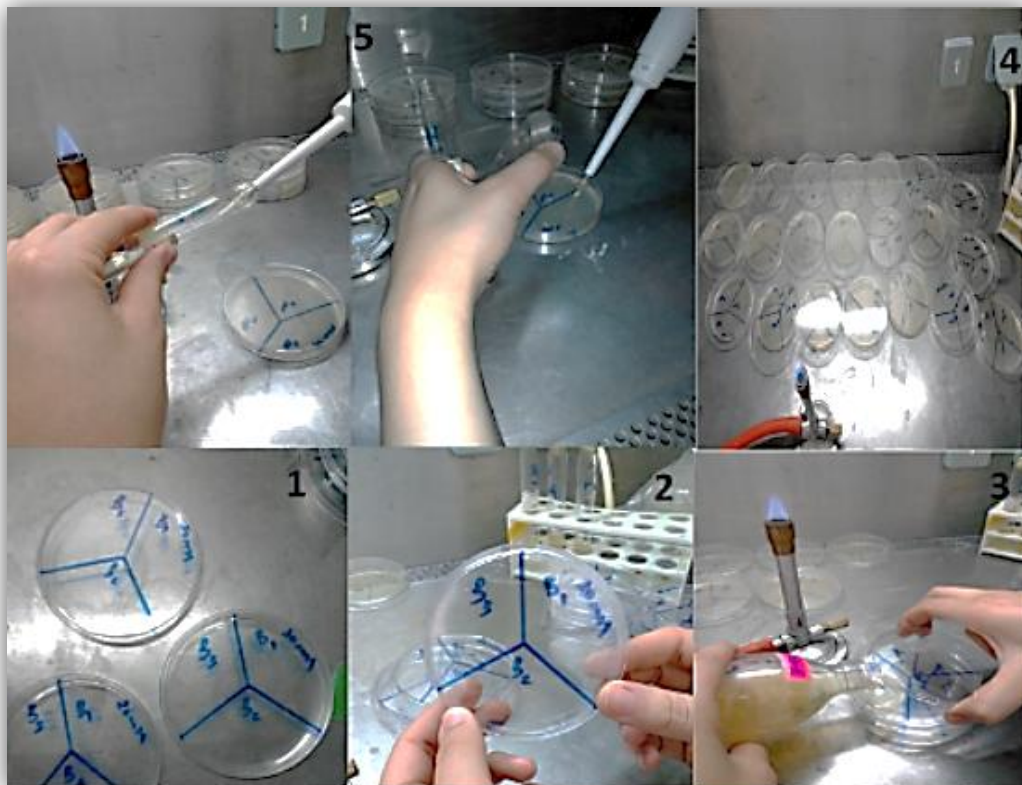


Figure10: Etapes du test de tolérance des bactéries au zinc

1-2-Effet du Zinc sur la motilité bactérienne(Swimming test)

La motilité bactérienne est évaluée sur le milieu TY semi solide (0,3%) selon la technique écrite par Murray *et al.*, (2010). Les cultures bactériennes sont standardisées à une concentration bactérienne de 10^5 à 10^6 cellules/ml (bactéries en phase exponentielle). Dix μ l de chaque culture sont déposés sur le milieu de culture en enfonçant légèrement la pointe dans le milieu de culture. Chaque souche a subi trois traitements : un traitement de stress (5mM de Zinc), un traitement de stress (concentration juste inférieur a la CMI) et un traitement contrôle (sans métal). Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement et chaque souche. Les boites sont incubées à 28°C pendant 3-5 jours selon les souches et on détermine le diamètre du halo de motilité (Murray *et al.*,2010).

2-Tolérance de *Cicer arietinum* au Zinc

2-1- Culture et traitements

L'étude du potentiel de tolérance de la plante vis-à-vis du Zinc, est réalisée dans une culture hydroponique (figure11). Les graines germées sont mises dans des tubes à essai stériles, remplis par une solution nutritive. Une gamme de concentrations en Zinc est préparée à partir d'une solution mère concentrée (500mM) en utilisant le $ZnSO_4$ sous forme de poudre. Après stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min, la solution mère est utilisée pour la réalisation des solutions nutritives azotées (contenant du KNO_3), contenant différentes concentrations finales en Zinc (200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000 et 5000 μ M)(Annexe). Chaque solution est complétée à 20ml de volume final avec la solution nutritive stérile azotée. Nous avons préparé un témoin positif contenant la solution azotée sans présence du métal. Les répétitions étaient faites 10 fois pour chaque cas.

Les plantes sont maintenues en chambre de culture, pendant une durée égale à 20 jours, dans les mêmes conditions que celles du test de mobilisation du phosphate. Un suivie journalier est effectué afin de suivre et détecter tout changement phénotypique de la plante.

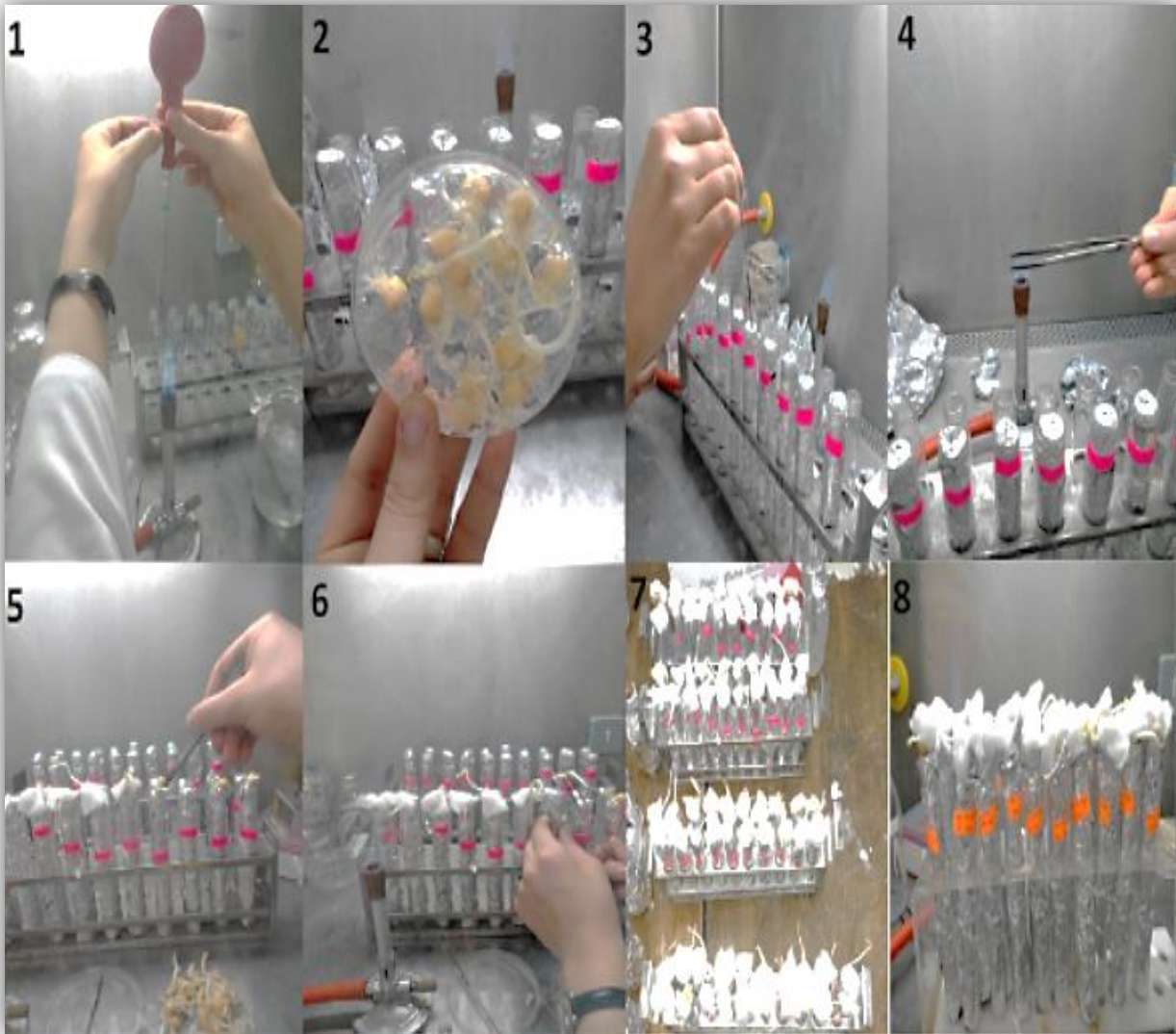


Figure11: Etapes du test de tolérance du *Cicer aritinum* au Zinc

2-2-Détermination la CMI

Afin d'évaluer l'effet du stress sur la croissance des plantes soumises aux tests, nous avons déterminé la CMI (concentration minimale inhibitrice) de la plante par comparaison des changements de phénotypiques de la plante soumise aux différentes concentrations en Zinc .

3- Effet de l'inoculation et la co-inoculation bactérienne sur la tolérance au Zinc chez *Cicer arietinum*

L'évaluation de l'effet de l'inoculation par les trois bactéries sélectionnées sur la croissance de la plante en présence et en absence du Zinc (en concentration létale),est réalisée en

culture hydroponique comme le cas du test précédent. Chacun des tubes contient une graine germée stérilement et inoculé avec 1 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance contenant la ou les souche(s) convenable(s) (figure12).



Figure12: Etapes d'inoculation et de co-inoculation des graines

Les cultures sont placées dans une chambre de culture dans les mêmes conditions décrites plus haut. L'effet bactérien de l'amélioration de la tolérance au Zinc de la plante est évalué par la mesure de quatre paramètres de croissance : La longueur de la partie aérienne ; Poids frais de la partie aérienne ; Longueur du système racinaire ; Poids frais du système racinaire. Différents traitements réalisés sont réalisés (tableau5).

Tableau 5: Traitements réalisés dans l'inoculation et la Co inoculation de *Cicer arietinum* en présence de sa CMI en zinc

Traitement	Nombre de repetitions
B1+ la CMI en Zinc	10
B2+ la CMI en Zinc	10
B3+ la CMI en Zinc	10
B1+B2+ la CMI en Zinc	10
B1+B3+ la CMI en Zinc	10
B2+B3+ la CMI en Zinc	10
B1+B2+B3+ la CMI en Zinc	10
Contrôle négatif (sans Zinc)	10
Contrôle positif (avec la CMI en Zinc)	10

V-Analyses statistiques

Les résultats obtenus pour les cas de phosphate et Zinc, ont subi une analyse bidirectionnelle de la variance, en comparant les moyennes par le test de Fisher (Significiance a $p \leq 0,05$).

CHAPITRE III:

Résultats et Discussion

I-Vérification des caractères morphologiques et culturaux des souches utilisées

1-Croissance des isolats sur le milieu solide (YMA+RC)

Les bactéries examinées dans ce travail, apparaissent sur le milieu YMA après 1 à 5 jours, sous forme de colonies de forme homogène, circulaire à surface bombée et à contour régulier avec un aspect lisse brillant, une texture translucide et une consistance visqueuse. La taille des colonies varie entre 0,3-0,5cm. Ces colonies sont soit transparentes soit apparaissent avec une couleur blanche, crème ou légèrement rose, en absorbant peu ou pas le rouge de Congo (figure13). Toutes ces caractéristiques sont concordantes avec celles de Vincent (1970) et Jordan(1984), ce qui montre que nos bactéries sont bien des rhizobiums purs (figure13).

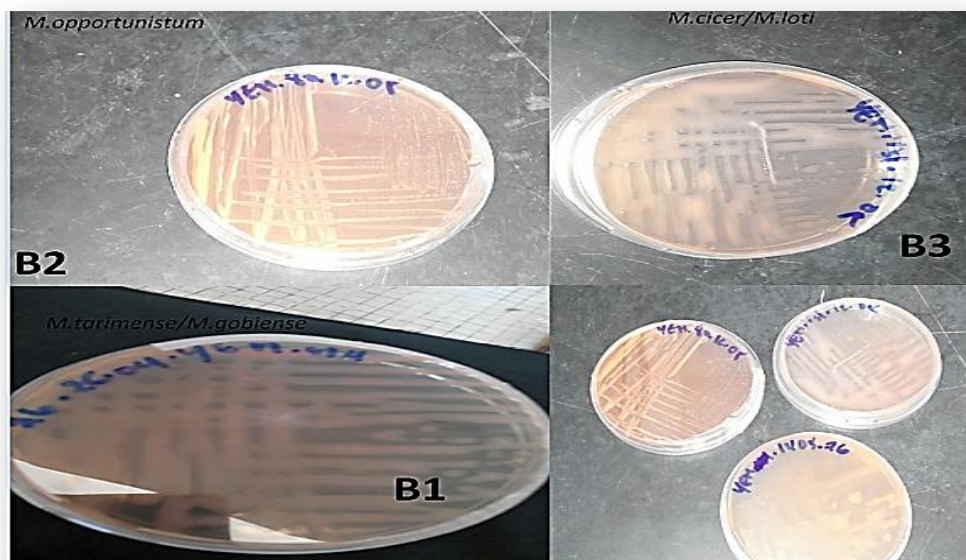


Figure13: Aspect des colonies sur YMA+Rouge Congo

2- Croissance des souches sur le milieu liquide(YMB):

Après 3 jours, la totalité des souches montrent un trouble du milieu. Ceci est en accord avec les caractéristiques du rhizobium à croissance modérée sur milieu YEM liquide, notamment celles du rhizobium nodulant le pois chiche (Nour et al, 1994 ; 1995). La densité de ce trouble est dépendante de la bactérie considérée, cette densité est vérifiée par mesure spectrophotométrique périodique de la densité optique à 600 nm pendant 5 jours.

II-Test d'antagonisme entre les souches bactériennes:

Dans ce test, les observations ont portées sur la présence ou l'absence de la croissance bactérienne suite à une culture initiale d'une autre bactérie sur le même milieu (figure14).

La croissance des trois bactéries testées est variée probablement selon la sécrétion ou non de certaines substances bactériennes qui pourraient inhiber la croissance des autres. Ainsi la croissance de la deuxième bactérie serait dépendante de la nature et de la concentration des substances extraites par la première bactérie mise en culture en premier.



Figure14: Résultats du test d'antagonisme des souches bactériennes

En comparant entre les résultats des trois bactéries (tableau6), nous remarquons que les bactéries cultivées à la suite d'une culture de la bactérie B1 présentent une forte croissance. Ceci laisse penser que soit la bactérie B1 ne sécrète pas des substances inhibitrices pour les bactéries B2 et B3, ou bien ces substances sont présentes à des petites concentrations et soit que les bactéries B2 et B3 sont tolérantes aux extraits de B1.

Suite à une culture de B2, nous remarquons que contrairement à B3, la souche B1 ne présente qu'une faible croissance. Ainsi, il est probable que soit que la concentration des substances extraites par B2 est vraiment inhibitrice de la bactérie B1, soit que cette dernière ne tolère pas les extraits de B2 quel que soit leur concentrations. Les caractéristiques de B1 sont les mêmes suite à une culture de B3. Inversement à la bactérie B3 qui a montré une bonne croissance quel que soit la culture bactérienne initiale, la bactérie B2 a montré une croissance assez moyenne suite à la culture primaire de la souche B3.

Enfin la totalité des résultats obtenus *in vitro* suggèrent que la souche B3 est plus forte que B2 et B1 et donc est classée en premier, en termes de tolérance aux extraits des autres bactéries.

Tableau6: résultats d'antagonisme entre les souches bactériennes

Bactérie	Croissance successive des deux bactéries	Boite1	Boite2	Boite3	Interpretation du resultat
B1	B1+B2	+	+	+	Une fort croissance de B2
	B1+B3	+	+	+	Une fort croissance de B3
B2	B2+B1	+	-	-	Une faible croissance de B1
	B2+B3	+	+	+	Une fort croissance de B3
B3	B3+B1	+	-	-	Une faible croissance de B1
	B3+B2	+	+	-	Une moyen croissance de B2

+++ : une forte croissance, ++- : une moyenne croissance, +- : une faible croissance

De ces données on peut estimer l'ordre d'installation des trois souches dans le même nodule du pois chiche. C'est probablement la souche B3 qui s'est installée la première, suivie par la souche B2 et enfin B1.

III-Solubilisation du phosphate:

1-la capacité de solubilisation bactérienne sur le milieu YAD:

Les trois souches du *Mesorhizobium* sont comparées pour leur capacité à solubiliser le phosphate naturel, pour cela elles ont été cultivées sur milieu YAD solide (Annexe) avec comme seule source de phosphate le TSP (Triple Super Phosphate). Leur capacité de croissance sur ce milieu (nombre de colonies), le diamètre des colonies ainsi que le diamètre du halo clair entourant les colonies nous permettent d'en déduire sur la capacité de solubilisation du phosphate (tableau7) de ces bactéries.

Tableau7 : Croissance et solubilisation bactérienne du phosphate

	YAD-(sans p)	YAD+ (p soluble)	YAD			
	N.C	N.C	N.C	D.C	D.H	PSE
B1	4± 1,63	1	0	0	0	0
B2	9,7± 4,11	14,67 ± 2,62	5±1,63	3,67 ±1,25	7,33±2,62	200
B3	7,33± 0,47	11,33±5,44	3,33±2,49	4 ± 0,82	7± 1,63	175

N.C : nombre de colonie ; D.C : diamètre des colonies ; D.H : diamètre d'halot ; PSE :

Par comparaison des colonies obtenues sur les milieux témoins (sans phosphate et en présence du phosphate soluble) et le milieu contenant le TSP, la bactérie B1 s'est comportée différemment que les bactéries B3 et B2.

Les bactéries B2 et B3 ont montré le plus grand nombre de colonies sur le milieu contenant le phosphate soluble, elles ont montré moins de colonies sur le milieu déficient en phosphate et moins de colonies encore sur le milieu YAD en présence du phosphate naturel. Au contraire la Bactérie B1 n'a montré qu'une seule colonie en présence du phosphate soluble et une moyenne de 4 colonies en absence du phosphate. Ceci serait causé par une différence en concentration cellulaire du milieu liquide ensemencé sur les boîtes de pétries et l'erreur serait causée par une non homogénéisation du bouillon ensemencé. En présence du phosphate naturel aucune colonie de B1 n'a été détectée. Ceci serait expliqué soit par l'incapacité de la souche à solubiliser le phosphate soit à l'insuffisance du temps d'incubation de cette

bactérie, sachant que l'incubation des boîtes est réalisée pendant 5 jours alors qu'il existe des souches du *Mesorhizobium* qui nécessitent plus de temps.

Les bactéries B2 et B3 semblent avoir une capacité de solubilisation du phosphate puisqu'elles ont montré des halos clairs autour de leurs colonies. Selon le PSE obtenu nous pouvons dire que la bactérie B2 est la plus compétente dans la solubilisation du TSE par rapport à la bactérie B3.

La détection des bactéries solubilisatrices du phosphate sur boîte a été souvent utilisée avant toute inoculation de plante. Dans l'étude de Peix et *al.* (2001), la souche PECA21 (*M. mediterraneum*) était le solubilisant le plus rapide sur des boîtes de Pétri. Cette souche a produit la plus grande zone claire autour des colonies obtenues après 7 jours sur le milieu YAD et c'est en se basant sur ce résultat que cette souche a été sélectionnée pour les tests d'inoculation.

Plusieurs espèces et genres de bactéries ont été rapportés comme étant capables de solubiliser les phosphates. Halder et *al.* (1990) ont trouvé que, les souches isolées à partir de *Cicer*, étaient les meilleurs solubilisants du phosphate au sein du genre *Rhizobium*. Ainsi puisque nos trois souches étaient isolées des nodules du pois chiche (*Cicer-arietinum*), on s'attendait à voir une capacité de solubilisation assez importante *in vitro*. Les résultats sont acceptables pour les cas de B2 et B3 mais inattendus pour la bactérie B1. Ce résultat serait expliqué soit par des erreurs de manipulations telles que l'hétérogénéité d'inoculum utilisé ou le temps d'incubation insuffisant ou bien à d'autres raisons génétiques sachant que ces trois souches ne sont pas encore connues à être spécifiques pour le pois chiche comme les cas de *M. ciceri* et *M. mediterraneum* et leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques ne sont pas encore déterminées.

2-Mobilisation bactérienne de la solubilisation du phosphate chez la plante *Cicer arietinum*:

2-1-Test de germination:

Après 5 jours d'incubation, les graines stérilisées avec l'hypochlorite de sodium ont montré des radicules d'environ 2 cm (figure 15) et la contamination minimale détectée ne concernait que peu de boîtes. Ainsi la germination *in vitro* des graines avec le protocole de Vincent (1970) que nous avons modifié est réussie dans cette étude.



Figure15 : Aspect des graines stériles germées

2-2- plantes obtenus suite au testde mobilisation du phosphate

2-2-1-Absence et présence du phosphate soluble



Figure 16: Aspect des plantes témoins non inoculées

Contrairement aux témoins TP-1 (ne contient pas du phosphate) et TP+(contient du phosphate soluble), le témoin TP-2 (contenant le phosphate naturelle) est représentée par des plantes mortes 20 jours après leur semi. Ce résultat témoigne l'exigence de la plante en une source de phosphate soluble pour qu'elle puisse l'utiliser dans différentes réactions métaboliques assurant au moins sa croissance. L'aspect de la plante obtenu dans le cas de TP+1 est bien meilleur que celui du TP-2 puisqu'elle a sa source de phosphate soluble. Dans le cas du TP-2, les 20 jours de culture étaient suffisants pour que la plante reste vivante sans source exogène en phosphate, il est probable que dans cette période la plante utilise sa réserve de graine en phosphore.

Nos résultats sont concordants avec ceux de plusieurs études portant sur le rôle du phosphore soluble sur la plante légumineuse. Togay, (2008) a révélé que le phosphore augmente considérablement le poids sec des plantes légumineuses telles que la Fève, la Lentille et le Soja. Dans le même sens, Siddiqui, (2007) a rapporté que l'effet du phosphore était significatif sur le poids sec des légumineuses. La capacité d'absorption de phosphore a été signalée fortement liée à la production de matière sèche (Sulieman, 2002). En revanche, un manque du phosphore a un effet dépressif sur la nodulation, la pousse et la croissance des racines des légumineuses ainsi que sur la surface des feuilles (Togay, 2008; Tang et *al.*, 2001). De même, Sulieman et *al.*, (2009) ont montré que la croissance des légumineuses a augmenté plus rapidement avec l'augmentation de phosphore soluble dans la solution du sol utilisé.

2-2-2-Inoculation et co-inoculation (mobilisation bactérienne du phosphate)

Après 20 jours de culture, l'aspect des plantes inoculées est différent selon l'inoculum simple ou mixte et selon chacune des souches constituant l'inoculum (figure17). Le meilleur état de la plante est détecté pour la souche B2 suivie par B3 dans le cas d'inoculum simple et pour le binôme B2+B3 dans le cas de co-inoculation. Ce résultat est concordant avec celui du test de solubilisation invitro sur boîte de YAD.



Figure 17: Aspect des plantes inoculées

Pour mieux confirmer ce résultat nous avons mesuré quelques paramètres de croissance touchant la partie aérienne et le système racinaire (tableau8, figure18).

Tableau8 : Mobilisation bactérienne du phosphate sur la croissance du pois chiche

	TP-2	TP-1	TP+	B1	B2	B3	B1+B2	B1+B3	B2+B3	B1+B2+B3
L.R	6,43 ^c ± 2,15	7,4 ^a ±2,2	7 ^c ±1,79	5,2 ^a ±2,14	5,93 ^c ±1,78	5,55 ^c ±2,78	6,3 ^c ± 2,9	4,55 ^a ±1,80	7,8 ^c ±3,16	6,1 ^c ±3,06
L.A	18,14 ^a ±12,55	37,7 ^a ±5,78	32,5 ^a ±4,5	13,3 ^c ±2,15	21,4 ^c ±5,79	17 ^c ± 9,96	21,2 ^a ± 9,18	17,6 ^a ±11,12	27,7 ^a ±4,43	19,1 ^c ±7,26
P.R	0,67 ^b ± 0,43	1,03 ^a ± 0,40	1,06 ^c ±0,54	0,45 ^a ±0,22	0,57 ^a ±0,26	0,8 ^c ± 0,40	0,61 ^a ±0,43	0,66 ^b ±0,41	0,71 ^b ±0,27	0,9 ^c ±0,45
P.A	0,357 ^a ± 0,26	1,25 ^a ± 0,89	0,09 ^c ± 0,83	0,09 ^a ± 0,03	0,41 ^a ± 0,28	0,35 ^a ± 0,22	0,44 ^a ± 0,37	0,3 ^a ± 0,35	0,77 ^b ± 0,47	0,39 ^a ± 0,29

L.R : longueur de la racine, L.A : longueur de la partie aérienne, P.R. poids frais racinaire, P.A : poids frais de la partie aérienne. a : très significatif (p<0,05), b : faiblement significatif (p=0,05), c ; non significatif (p>0,05)

En se basant sur le témoin TP-2 (présence de phosphate soluble) qui présente les meilleurs paramètres de croissance, nous remarquons que ces paramètres sont différents entre les différents cas de traitement et entre les cas d'inoculation simple et combinée.

*Système racinaire

Dans le cas de longueur de racine et pour l'inoculation simple, il est remarqué que malgré que chacune des bactéries B2 et B3 a montré une longueur supérieure à celle de la bactérie B1 (figure18), le résultat de cette dernière est le seul à être significatif (p≤ 0,05). Ainsi on considère que la bactérie B1 a pu agir d'une façon significative pour solubiliser et mobiliser le phosphate vers les différentes parties de la plante, ce qui a permis d'avoir une longueur racinaire plus ou moins importante même si cette dernière est nettement inférieure à celles des témoins notamment celle du TP-1.

Dans le cas de la co-inoculation, le seul résultat qui semble être significatif est celui de la combinaison entre les souches B1 et B3 (tableau8), même si certains résultats de l'inoculum mixte sont plus importants que celui du témoin TP-1, comme le cas de B2+B3.

Dans le cas de longueur de la partie aérienne, l'inoculation simple ne montre aucun résultat significatif alors que la totalité des résultats de l'inoculum mixte à deux souches montre un résultat significatif. Le résultat le plus important est celui du mixte B2+B3 (figure18).

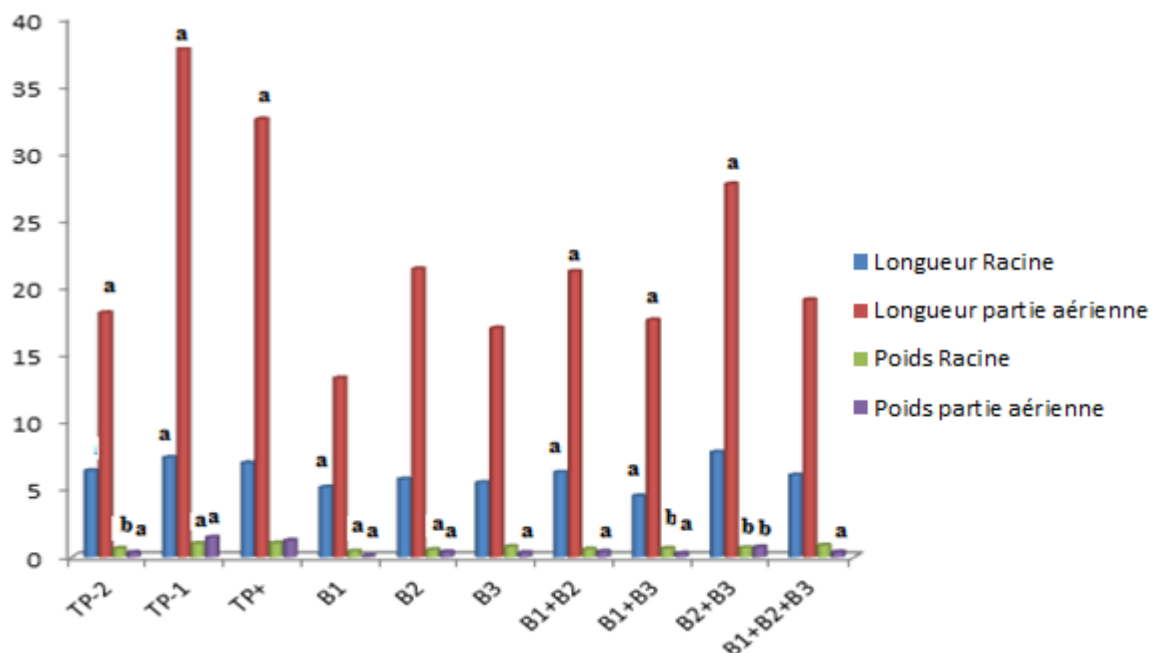


Figure18: Effet bactérien sur la croissance du pois chiche

*Partie aérienne

Pour le poids frais racinaire, la bactérie B3 est la seule qui n'a pas montré un résultat significatif dans le cas d'inoculation simple alors que la bactérie B2 a montré le meilleur résultat. Pour l'inoculation à deux souches, tous les cas ont montré un résultat significatif bien que le meilleur résultat est donné à la combinaison de B1 + B2.

Dans le cas du poids frais de la partie aérienne, tous les cas d'inoculations ont montré un résultat significatif mais l'effet le plus important est donné pour la souche B2 dans le cas d'inoculation simple, pour l'inoculum mixte de B1+B2 et enfin pour la triple combinaison B1+B2+B3. Cette dernière n'a donné un résultat significative que pour le cas de poids de la partie aérienne.

En combinant les résultats des quatre paramètres de croissance examinés dans ce travail, nous remarquons que dans certaines inoculations l'effet bactérien de mobilisation du phosphate n'est pas détecté pour tous les paramètres. En effet parmi les trois inoculums simples, celui de la bactérie B1 est le seul qui a montré un effet positif significatif sur la longueur de la plante que ce soit sur la racine ou bien sur la partie aérienne. Il semble que chacune des

bactéries agit beaucoup plus sur le pois frais, notamment les bactéries B1 et B2. L'effet significatif détecté des bactéries pourrait classer ces dernières en B1 puis B2 suivie par B3.

Pour le cas de combinaison de deux bactéries il semble que la combinaison B1+B3 est la meilleure montrant un effet significatif sur les deux parties de la plantes que ce soit dans la longueur ou sur le poids frais. Contrairement a ce cas, la triple combinaison (B1+B2+B3), ne semble avoir un effet positif que sur la partie aérienne et que sur le poids frais de cette dernière. Ce resultat pourrait classer les mixtes d'inoculum en B1+B3 ensuite B1+B2, suivi par B2+B3 et enfin B1+B2+B3.

Ce qui est remarquable entre la le resultat du test de solubilisation du phosphate sur boite et l'effet d'inoculation sur la croissance de la plante c'est que B1, montrée incapable de solubiliser le phosphate sur boite, montre le meilleur resultat sur la croissance de la plante que ce soit en état simple ou en état combiné avec l'une des autres souches. Ceci confirme l'hypothèse que sur boite, le résultat negative de cette souche serait expliqué soit par une heterogeneité de l'inoculum ensemencé soit par l'insufisance du temps d'incubation.

Les micro-organismes qui solubilisent le phosphate ont été considéré comme PGPR (Plant Growth Promouvoir Rhizobacteria), bien que leur rôle sur la croissance des plantes est un sujet de controverse. Certains auteurs pensent que l'inoculation de sol avec des micro-organismes solubilisateurs du phosphate peut augmenter les rendements des cultures en produisant des substances spécifiques à la croissance telle que la production de facteurs de croissance (Tinker, 1980). D'autres études ont montré que l'inoculation du sol avec ces micro-organismes permettent d'obtenir des rendements des cultures similaires à ceux obtenus par addition de phosphore soluble (Ralston et McBride, 1976). Quel que soit le cas, ces bactéries permettent une augmentation de la croissance de la plante, ce qui est recherché pour une agriculture durable. Pour cette raison plusieurs études sont actuellement lancées pour la recherche des bactéries solubitrices du phosphate. Les résultats de Peix et *al* (2001), portant surf l'orge et le pois chiche, montrent que la souche *M. mediterraneum* PECA21 était capable de mobiliser le phosphore efficacement dansle pois chiche lorsque le phosphate tricalcique a été ajouté au sol. En effet, pour l'orge et le pois chiche et dans les sols traités avec des phosphates insolubles et inoculés avec la souche PECA21 la teneur en phosphore a été significativement augmenté avec 100 et 125%, respectivement. En outre, la matière, l'azote, le potassium, le calcium et le magnésium teneur en matière sèche dans les plantes a été augmentée aussi.

Dans notre étude, le meilleur résultat est donné par la souche B1 comme inoculum simple et par la combinaison B1+B2 comme inoculum mixte. La souche B1(*M.tarimense/M.gobiense*) soit a l'état simple soit a l'état combiné, a la capacité de solubiliser le phosphate en une forme assimilable pour la plante. Cette capacité est moindre pour les deux autres souches testées.

Ainsi en plus de la fixation d'azote les trois souches du *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche, examinées dans cette étude, jouent le rôle PGPR pour cette plante. Ces souches peuvent être sélectionnées pour augmenter le rendement du pois chiche notamment la bactérie B1(*M.tarimense/M.gobiense*).

VI-Etude de tolérance au zinc:

1-Test de tolérance des bactéries au zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

1-1-La concentration minimale inhibitrice (CMI)

Afin de sélectionner les souches tolérantes au zinc, nous avons réalisé un test de tolérance sur milieu TY solide supplémenté au zinc à des concentrations allant de 1,25mM jusqu'à 30mM, le choix des concentrations est basé des travaux publiés dans ce contexte. Les observations ont portées sur la présence ou l'absence de la croissance bactérienne sur le milieu TY solide (annexe), contenant le Zinc, tout en comparant le milieu témoin qui ne contient pas du Zinc. Cette croissance est variable selon la bactérie et selon les concentrations utilisées (figure19).

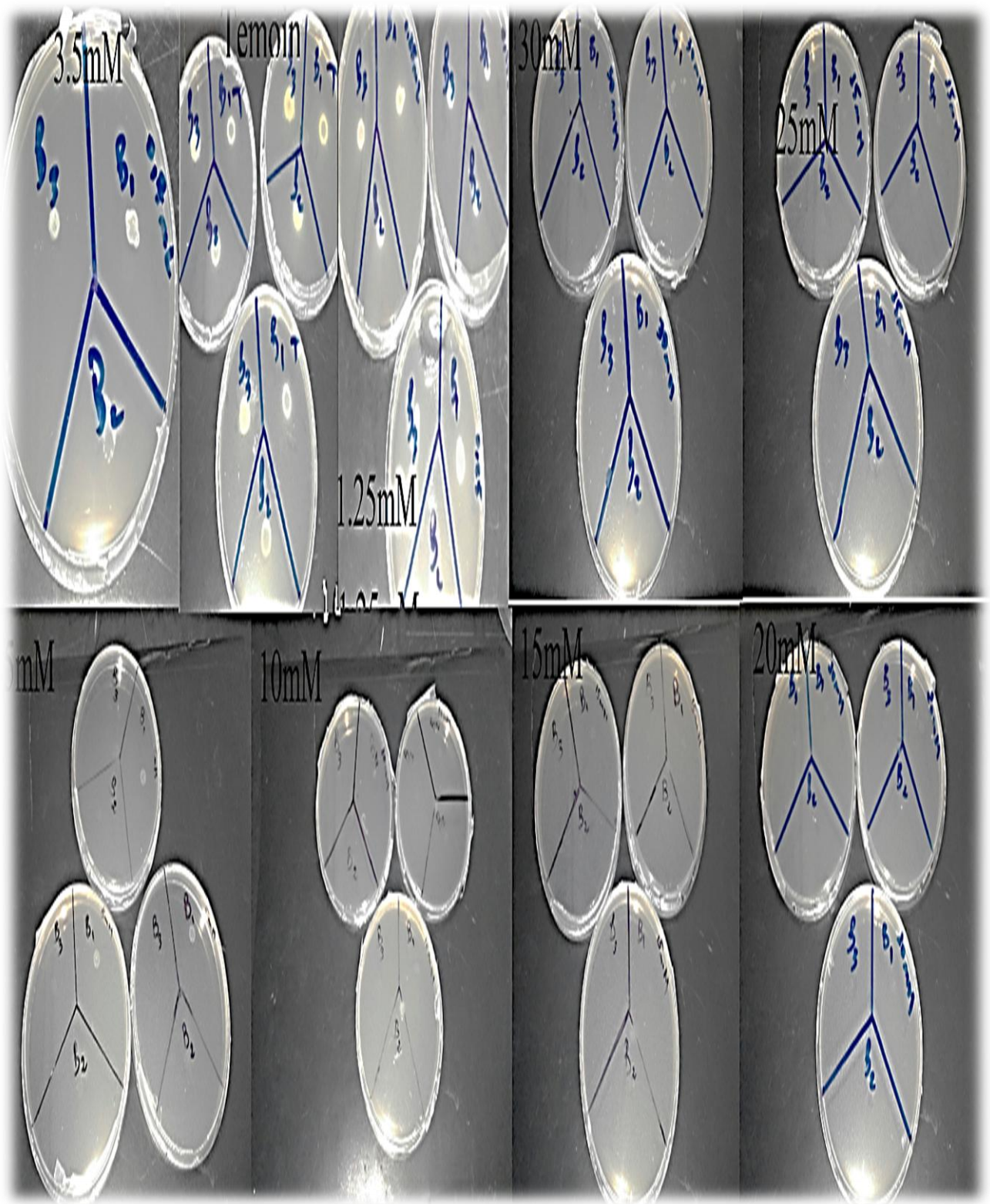


Figure19: Tolérance de *Mesorhizobium* aux différentes concentrations de Zinc sur milieu TY

La croissance de chacune des bactéries B2 et B3 est arrêtée après une concentration de 1,25mM alors que celle de la bactérie B1 a dépassé cette concentration puisque sa croissance est inhibée seulement après la concentration de 5mM (tableau). Nous pouvons ainsi situer la

concentration minimale inhibitrice (CMI) dans l'intervalle $1,25 < \text{CMI} \leq 3,5$ pour B2 et B3 et $5 < \text{CMI} \leq 10$ pour B1 selon les concentrations examinées dans cette étude. Ainsi la bactérie B1 se montre clairement plus tolérante au Zinc que les deux autres.

Tableau9: Tolérance au Zinc des souches et diamètre des colonies sur les concentrations de 1,25 et 3,5mM

	1,25	3,5	1,25	3,5	5	10	15	20	25	30
B1	+ (DC= 6,67 ±1,25)	+(DC=4,67±0,47)	+	+	+	-	-	-	-	-
B2	+(DC=4,67 ± 0,94)	+(DC=5,67 ±0,47)	+	-	-	-	-	-	-	-
B3	+ (DC= 5± 0,82)	+(DC= 3,33 ^a ± 0,47)	+	-	-	-	-	-	-	-

a : test significatif ($P < 0,05$) ; DC : diamètre des colonies

Puisque la CMI des deux bactéries B2 et B3 se situe dans le même intervalle, et puisqu'on ne pouvait pas tester d'autres concentrations de Zinc par manque de temps, nous avons comparé le diamètre des colonies entre ces deux bactéries pour des concentrations inférieure à leur CMI (tableau) tout en prenant la souche B1 comme témoin tolérant. Le résultat est non significatif pour la concentration de 1,25 Mm (Ilya pas de différence entre les trois bactéries). Pour la concentration 3,5Mm, le test est significatif pour le cas de la bactérie B3. Ceci nous permet de dire que la bactérie B2 est tolérante à la concentration 3,5Mm de la même façon que B1. Ainsi nous pouvons dire qu'*in vitro* et sur boîte TY, la bactérie B1 est la plus tolérante au Zinc suivie par la bactérie B2 puis B3.

Nous n'avons pas pu comparer les intervalles des CMI trouvés dans cette étude avec ceux des références concernant les souches nodulaires du pois chiche et leur tolérance au Zinc car nos souches sont génétiquement différentes que celles trouvées au pare avant dans les études précédentes. Néanmoins, cette différence en tolérance pour le zinc est concordante avec les résultats des travaux portés sur les rhizobiums. Selon Kinkel et *al* (1987), les rhizobiums réagissent variablement aux différents types de métaux lourds et ceci en fonction des concentrations appliqués. Wilson et Reissensauer (1970), ont confirmé que le manganèse et le Zinc affectent négativement la croissance des rhizobias. Un excès en Zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des rhizobias mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (Casella et *al.*, 1988, Giller et *al.*, 1998). Il est à noter que les CMI estimés dans cette étude sont en déduit après une culture de 5 jours, il serait probable que pour une durée d'incubation plus longue, les résultats pourraient être

modifiés. En effet, selon Griller et al (1998), l'effet des métaux lourds dépend de la durée de l'exposition, de la dose et de type de métal utilisé.

1-2-Motilité bactérienne

Le mouvement actif des bactéries nécessite l'existence d'un appareil de mobilité tel que les flagelles, permettant de générer certains mouvements des bactéries. Dans notre travail le mouvement qui nous intéresse est la « nage » des bactéries, car elle constitue toute une stratégie physiologique développée par les bactéries face à un stress.

Le « swimming » des bactéries est évalué par une présence d'un halo ou une ligne claire de motilité démarrant du point d'ensemencement de la bactérie, en comparaison entre le cas testé et son témoin (figure20). Nous avons choisi pour ce test deux concentrations (3,5 et 5 mM) qui sont juste inférieure à la CMI de la souche B1 trouvée la plus tolérante dans le test précédent et qui sont inhibitrices pour les autres bactéries et viennent juste après leur CMI, pour vérifier si le Zinc agit sur leur motilité (figure20).

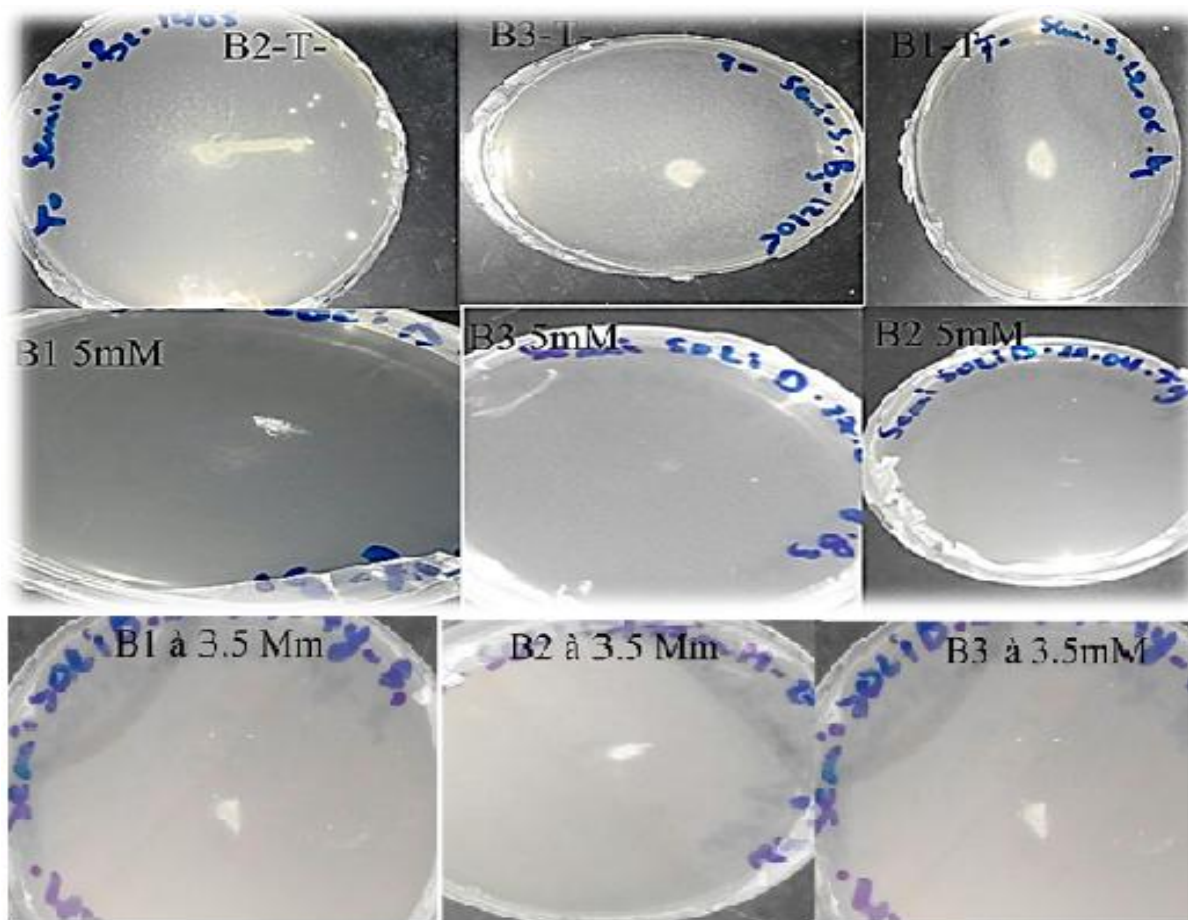


Figure20 : aspect des colonies des souches en présence du zinc sur milieu TY (0,3%).

Par comparaison des halos obtenus, nous nous sommes basés sur trois types d'observation pour classer les souches selon leur motilité (tableau 10). Nous avons pu détecter une motilité importante et celle-ci est détectée dans le cas du témoin pour chacune des trois bactéries. Une motilité moyenne est observée pour les trois bactéries aussi pour la concentration 3,5mM ainsi que pour la bactérie B1 pour la concentration 5mM.

Tableau 10 : motilité des souches bactériennes en présence du Zinc, sur le milieu TY semi solide

	Témoin	CMI =3.5Mm	CMI=5Mm
B1	++	+	+
B2	++	+	-
B3	++	+	-

++ : Mobilité importante, + : mobilité moyenne - : pas de mobilité

la souche B1 est la seule qui est mobile à la concentration 5mM. Ce résultat est concordant avec le test précédent montrant que B1 est la seule résistante à cette concentration par rapport aux deux autres. À cette concentration la bactérie B1 peut encore bouger pour essayer de s'échapper à la toxicité du milieu alors que les deux autres bactéries sont totalement inhibées. Le test de motilité à la concentration de 3mM, comparé au test de tolérance précédent, nous montre que l'inhibition de la motilité de la souche serait parmi les dernières étapes de la mort cellulaire face à une toxicité du Zinc. En effet, pour la concentration 3mM, les bactéries B2 et B3 ont montré une mobilité alors que pour cette concentration leur croissance est montrée inhibée dans le test de tolérance. Ainsi ceci pourrait être expliqué par le fait qu'avant leur mort, ces deux bactéries ont utilisé leur motilité pour échapper à la toxicité de cette concentration en Zinc.

Les produits codés par les gènes résistants au métal lourd peuvent réduire ou éliminer la toxicité de métal lourd par des mécanismes très complexes (wei et *al.*, 2009). Ils consistent soit à la synthèse de protéine ou de polymères extracellulaires qui adhèrent au métal; soit par compartimentation à l'intérieur des cellules et soit par le moyen le plus commun, la diminution de l'assimilation des aliments (Ross,1993. Tomsette,1993). Le maintien de la motilité reste aussi un mécanisme de tolérance par excellence aux stress abiotiques notamment le stress osmotique et métallique en garantissant à la cellule

bactérienne un échappement des conditions stressantes vers une niche écologique stable et favorable à l'installation de l'espèce et sa multiplication.

2-Tolérance au Zinc du pois chiche

Le test de tolérance au zinc a été réalisé par la mise en culture sur milieu nutritif hydroponique additionné de différentes concentrations de zinc pendant une durée de 20 jours. Plusieurs concentrations sont utilisées.

Pendant les premiers cinq jours en conditions de stress, nous n'avons noté aucune différence de croissance. Après cette période, les premiers signes de réponse au stress ont apparus au niveau des concentrations supérieures à $200\mu\text{M}$ et au bout du 7^{ème} jour, nous avons remarqué un dépérissement total des plantes aux concentrations supérieures à celle-ci (figure21). Selon ce résultat, la CMI du Zinc est supérieur à $200\mu\text{M}$ pour le pois chiche et plus précisément la CMI $\leq 400\text{Mm}$ selon la série de concentrations utilisée dans cette étude. Ainsi la concentration en Zinc supérieur à $200\mu\text{M}$ est toxique pour cette plante. Plusieurs chercheurs ont rapporté que cette toxicité peut s'exprimer par des altérations de nombreux processus physiologiques au niveau cellulaire et/ou moléculaire. La dénaturation et l'inactivation des enzymes, le blocage des groupes fonctionnels de molécules métaboliquement importantes, le déplacement ou le remplacement d'éléments essentiels, perturbant ainsi l'intégrité des membranes cellulaires. (Rosse et Kaye, 1994; Rascio et Navari-Izzo,2011).

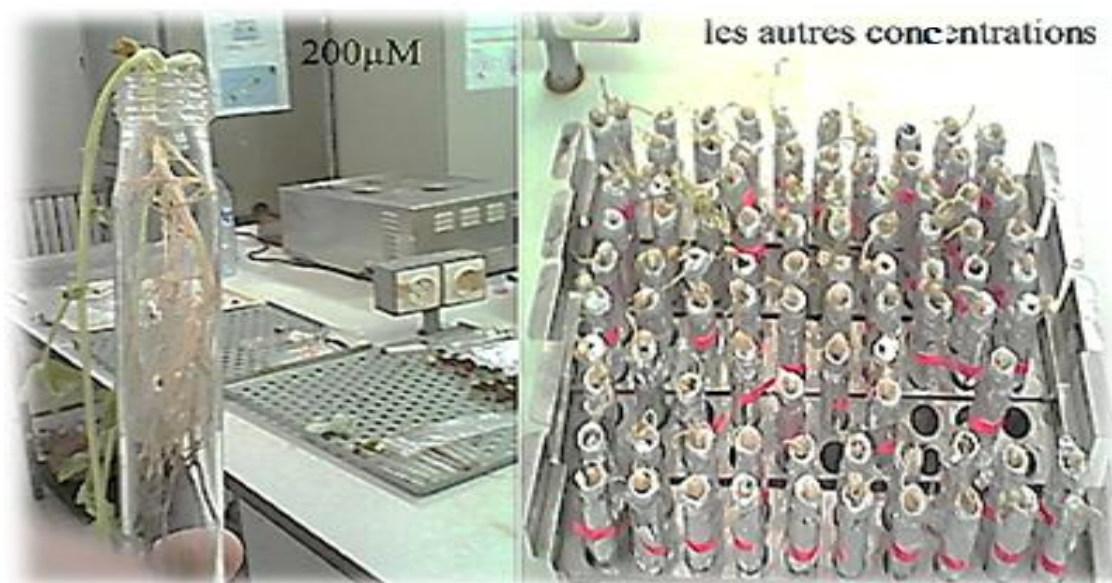


Figure21 : Effet du Zinc sur *Cicer arietinum*

3-Effet de l'inoculation et co-inoculation sur la tolérance en Zinc du pois chiche

L'objectif principal escompté dans cette partie du travail, était de vérifier l'amélioration du potentiel de tolérance du zinc via l'interaction plante-bactéries associées. Les 3 bactéries utilisées ont montré lors des différents tests menés, un potentiel d'activités bénéfiques pour la tolérance au zinc sur partie de plante et on voulait voir l'effet de leur association à la plante sur la croissance de cette dernière. Nous avons élaboré deux hypothèses en ce qui concerne le devenir du Zinc en présence des bactéries et des plantes: soit que les souches tolèrent le Zinc par une séquestration intracellulaire, soit qu'elles augmentent le niveau d'accumulation du Zinc chez *le pois chiche* par voie de solubilisation. Si l'effet serait positif pour nos bactéries, ceci envisagerait leur emploi en tant que PGPR.

L'effet des différents traitements d'inoculation sur le poids frais des plantes mises en culture hydroponique en présence d'une concentration létale en zinc ($400\mu\text{M}$) a permis d'avoir des plantes à un état déprimés (figure 22), quel que soit le cas de traitement sauf pour le cas du témoin négatif (absence de zinc).



Figure22: Effet de l'inoculation et la Co-inoculation sur la tolérance au zinc chez *Cicer arietinum* en culture hydroponique

Lors de cette expérience nous nous sommes basés sur quelques paramètres de croissance du pois chiche touchant la partie racinaire et la partie aérienne en les comparant à la fois au témoin négatif T- (en absence du zinc) et au témoin positif T+ (contenant une concentration 400, supposée être la CMI en Zinc) (tableau 11).

Tableau11 : Paramètres de croissance du pois chiche en présence de la CMI en Zinc et des bactéries

	T-	T+	B1	B2	B3	B1+B2	B1+B3	B2+B3	B1+B2+B3
L.R	15,33±8,50	4,8 ^a ±4,56	7,2 ^a ±5,64	6,6 ^a ±4,61	4,8 ^a ±4,75	4,64 ^a ±48	3,8 ^a ± 4,09	2,3 ^a ±3,26	2,7 ^a ±2,79
P.R	0,46±0,300	0,06 ^a ±0,08	0,1 ^a ± 0,09	0,07 ^a ±0,09	0,14 ^a ±0,012	0,06 ^a ±0,09	0,04 ^a ±0,07	0,02 ^a ±0,06	0,04 ^a ±0,07
L.A	17,82 ^c ±9,29	2,5 ^c ±3,07	2,9 ^c ±2,74	3 ^c ±2,19	3,1 ^c ±3,94	2,6 ^c ±3,56	0a*	0,8 ^c ±2,09	3,9 ^c ±1,58
P.A	0,51 ^a ±0,33	0,03 ^a ±0,06	0,07 ^a ±0,10	0,05 ^a ±0,09	0,05 ^a ±0,10	0,07 ^a ±0,09	0	0,01 ^a ±0,03	0,04 ^a ±0,07

T- : absence du Zinc ; T+ : présence de la CMI en zinc ; a : significatif par rapport au témoin T- ; b: non significatif par rapport au témoin T- * : significatif par rapport au témoin T+

***Partie racinaire**

En comparant avec le T-, que ce soit pour la longueur ou le poids frais du système racinaire, tous les résultats d'inoculation ou bien de co-inoculation sont significatifs ($p < 0,05$). En effet quel que soit le moyen qui aide à la plante à surmonter la toxicité, la plante se trouve dans son bon état en absence du Zinc. Néanmoins, en présence de la CMI, il semble que la plante se trouve beaucoup plus meilleur en présence de la bactérie B1 en cas de longueur du système racinaire, et de B3 en cas de son poids frais mais toujours se trouve à un mauvais état par rapport à l'absence du Zinc (T-) (figure23).

Contrairement à la comparaison au témoin négatif, ces résultats comparés au Témoin positif (présence de la CMI en Zinc) sont tous non significatifs ($p > 0,05$). Ce ci dit, l'effet des inoculums testés sur les plantes est négligeable dans le cas des paramètres de croissance du système racinaire. Nous pouvons dire que les bactéries n'ont pas pu immobiliser ou solubiliser la quantité de zinc présente et ainsi le système racinaire s'est trouvé en face de cette toxicité comme le cas du témoin T+.

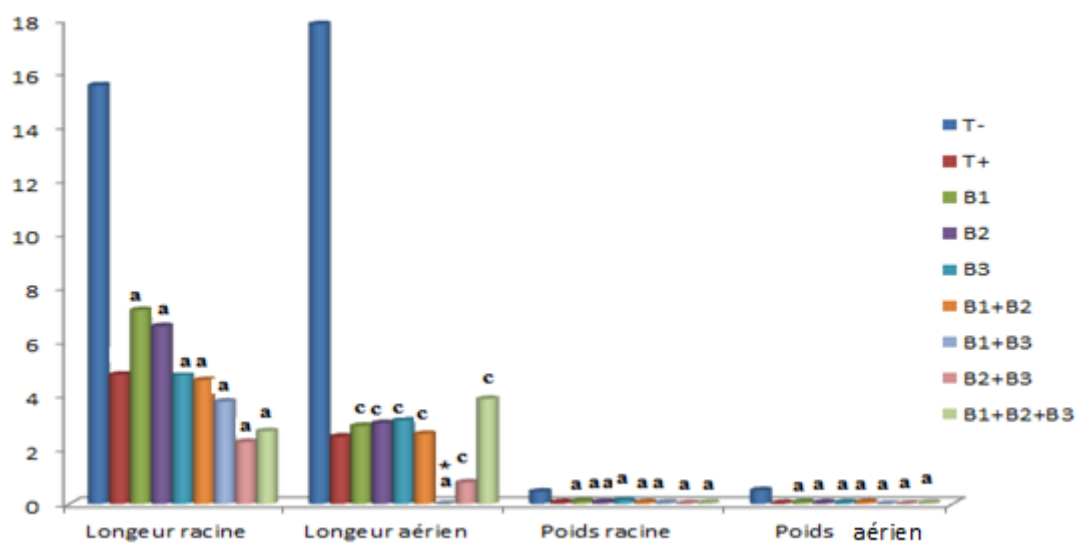


Figure23 : effet des bactéries et le Zinc sur la croissance du pois chiche

*Partie aérienne

Par comparaison au T-, il semble que contrairement à la longueur, le poids frais est significativement touché en présence du Zinc (figure23). En présence du Zinc, la plante n'arrive plus à réaliser sa photosynthèse ni faire un cumule du poids. Le seul cas significatif pour la longueur de la partie aérienne est celui d'inoculum B1+B3 ou la plante est carrément tuée juste après le semi de la graine (pas de racine, pas de tige). Les résultats comparés au témoin T+, sont tous non significatifs comme le cas du système racinaire. En effet le système racinaire est la première partie qui se trouve en face du danger au niveau du sol, s'il ne peut dépasser ce danger, la partie aérienne ne le pourra pas. Ainsi les inoculums testés n'ont pas pu améliorer la tolérance de la plante pour la CMI du zinc utilisé dans ce test.

Donc en associant les résultats portant sur le système racinaire ainsi que ceux portant sur la partie verte, nous pouvons conclure que les différentes bactéries utilisées ainsi que leur association n'a pas d'effet significatif sur la tolérance de la plante à la concentration 400µM en Zinc, pourtant la CMI des bactéries invitro sur boîtes est beaucoup plus supérieure. Ce résultat serait expliqué par le fait que la concentration (400 µM) du zinc utilisée est trop forte pour la plante. En effet, sachant que nos souches sont à croissance lente, celles-ci prennent beaucoup de temps pour pouvoir s'adapter à leur milieu notamment à préparer leur système d'adaptation comme celui de la solubilisation ou l'immobilisation du Zinc. Entre temps la

plante est carrément exposée à la toxicité d'une grande concentration létale pour elle et donc serait morte avant que les bactéries travaillent sur le Zinc. Il est probable que si on avait pris une concentration inférieure à 400 μM (supérieur à 200 μM), le résultat serait différent et l'effet bactérien pourrait être montré. Il est à rappeler qu'au cours de cette étude, la vraie CMI de la plante n'est pas calculée et la concentration 400 μM en Zinc qu'on a utilisée dans ce test n'est qu'une limite pour l'intervalle de la CMI.

Chercher et sélectionner les bactéries qui améliorent la tolérance des plantes aux métaux a été l'objectif de plusieurs recherches. Les résultats de Abbes et Kamel (2004) ont montré que la sélection de souches résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Selon Carrasco et al (2005), la recherche et l'isolement des bactéries symbiotiques résistantes aux métaux fait l'objet de plusieurs études. Leur tolérance et leur utilisation en symbiose avec la plante hôte aux métaux lourds peut-être utile pour la restauration des sols contaminés.

Le résultat non significatif trouvé dans cette partie de travail, ne permet pas de trancher sur l'effet négatif de nos bactéries dans l'amélioration de la tolérance en Zinc. Le relancement du test avec des concentrations en Zinc inférieures à 400 μM , pourrait montrer leur effet positif.

Conclusion

Les bactéries PGPR (Plant Growth Promouvoir Rhizobacteria), sont actuellement un outil pour la restauration des sols et l'augmentation du rendement agricole. Le pois chiche étudié dans ce travail est un exemple des légumineuses dont le rendement est insuffisant au besoin au niveau de l'Algérie. Une étude précédente a permis d'isoler trois souches nodulaires de cette plante, qui sont génétiquement différentes des espèces connues être spécifiques au pois chiche (*M. ciceri* et *M. mediterraneum*) et connues être les plus importantes dans la solubilisation du phosphate.

Le but de cette présente étude, est d'examiner ces trois souches pour leur capacité à solubiliser le phosphate, le mobiliser dans la plante ainsi que pour leur potentiel à tolérer le Zinc et leur effet sur l'amélioration de la tolérance du pois chiche pour ce métal. Avant ces tests nous avons testé ces souches pour l'antagonisme entre elles.

Le test d'antagonisme a permis d'estimer l'ordre d'installation des souches dans le même nodule commençant par la bactérie B1 et terminé par B3.

La bactérie B2 semble être la plus intéressante pour la solubilisation du phosphate naturel (Triple Super Phosphate), invitro suivie par B3. Ce résultat n'est pas confirmé par le test d'inoculation. Dans le cas d'inoculation simple les bactéries sont classées en B1, B2 suivies par la bactérie B3. Dans le même sens, la co-inoculation utilisée montre que les inoculums sont classés en B1+B3 ensuite B1+B2, suivi par B2+B3 et enfin B1+B2+B, selon leur effet solubilisateurs sur la croissance du pois chiche.

Les tests de tolérances au Zinc réalisés sur boîtes de TY pour les bactéries et sur sable pour le pois chiche nous ont permis de situer les CMI's en μM dans des intervalles : $1,25 < \text{CMI} \leq 3,5$ pour B2 et B3 et $5 < \text{CMI} \leq 10$ pour B1. Celle de la plante est située dans l'intervalle $200 < \text{CMI} \leq 400$. La motilité des 3 bactéries pour échapper à la toxicité est montrée à la concentration $3,5 \mu\text{M}$ et à $5 \mu\text{M}$ que pour la souche la souche B1, ce qui prouve la plus grande tolérance au Zinc de B1 par rapport aux autres.

L'effet de l'inoculation et de la co-inoculation sur l'amélioration de la tolérance au Zinc pour le pois chiche sur milieu hydroponique c'est montré négligeable à la concentration

400 μM . un test à une concentration moindre devrait être relancé pour retester l'effet de nos bactéries.

Quelque soit le résultat obtenu pour le test de l'effet sur la plante en ce qui concerne l'amélioration de la tolérance aux Zinc, les résultats positifs concernant le potentiel de résistance des bactéries pour ce métal, leur capacité de solubilisation du phosphate *in vitro* ainsi que leur capacité de mobiliser le phosphate soluble vers les différentes parties de la plante, feraient classer ces trois bactéries parmi les PGPR recherchés pour décontaminer les sols et augmenter le rendement en agriculture notamment dans la culture du pois chiche.

Perspectives

Plusieurs points sont programmés comme perspectives, dont les plus importants sont:

- Tester la tolérance de la plante à des concentrations dépassant 200 μM et inférieur à 400 μM pour restester l'effet des trois bactéries sur l'amélioration de la tolérance au Zinc par la plante.
- Tester la tolérance de la plante et celles des bactéries en d'autres métaux tel que le plomb.
- Étudier certaines réponses physiologiques de la plante sous excès de zinc, en présence et en absence de chacune des trois bactéries en particulier la teneur en chlorophylle, la proline et des anthocyanines, pouvant être liés à la tolérance au stress.
- Entamer une étude fonctionnelle du gène ou gènes de la plante lors de son association avec des bactéries symbiotiques et endophytes par inoculation simple ou combinée, via des approches de génomique et protéomique fonctionnelles.
- Réaliser des études similaires sur d'autres variétés du pois chiche et sur d'autres bactéries nodulaires de cette plante.

Références bibliographiques

Abbas S. M., and E.A. Kamel., 2004. *Rhizobium* as a biological Agent for Preventing Heavy Metal Stress. Asian J. Plant Sc. 3, 416-424.

Alexandre A, Br'igido C, Laranjo M, Rodrigues S & Oliveira S., 2009. A survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. Microb Ecol 58: 930–941.

Allalih et Boussuar K., 2007. Etude des besoins en eau de la culture de pois chiche (*Cicer arietinum*) dans la région de Sidi Bel Abbés mémoire de fin d'études De DES Biologie et physiologie végétale.

Bashan Y, Holguin G., 1998. proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol Biochem 30(8); 1225-1228.

Bejiga et Van der Maesen L.J.G., 2007. *Cicer arietinum* L.In; Brink .M.,

Berger J.D., M. Alip.S. Basu, B.D. Chaudhary., 2006. Genotype by environment studies demonstrate the critical role of phenology in adaptation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to high and low yielding environments of India.

Biswas JC, Ladha J K, Dazzo FB.,2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. Soil Sci. Soc. Amer. J. 64:1644-1650.

Blencowe DK, Morby Ap., 2003. Zn (II) metabolism in prokaryotes, FEMS Microbiol Rev 27:2291-311.

Boivin , C., Giraud, E.,L.R., Malpica,C.A., and Rosenberg, C., 1997. Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite presente in legumes. Journal of Bacteriology. 173(9): 2809-2817.

Carrasco JA, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes MA, Lopez R, Chamber MA, Palomares AJ., 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. Soil. Biol. Biochem. 37: 1131-114.

Casella, S., J. P. Shapleigh, F. Lupi, and W. J. Payne., 1988. Nitrite reduction in bacteroids of *Rhizobium "hedysari"* sttttrain HCNTI. Arch. Microbiol. 149, 384-388.

Chabbert, Y. A., 1963. L'antibiogramme. Editions de la Tourelle, St-Mandé. pp. 78-81.

Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Ba A, Gillis M, de Lajudie P, Drefus B., 2000. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. Appl. Environ. Microbiol. 66:5437-5447.

Chen, W.M., James, E.K., Prescott, A.R., Kierans, M., and Sprent, J.I., 2003. Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. Mol Plant.Microbe. Interact 16, 1051-1061.

Choudhury, R., Srivastava, S., 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science* 81: 768-775.

Cronk, Q., Ojeda, I., Pennington, R.T., 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: 99-103.

D’Haeze, W., and Holsters, M., 2002. Nod factor structures, response, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiol.*, 12, 79R-105R.

Deakin WJ. And Broughton W.J., 2009. Opinion: symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 312-320.

Deshwal, V.K., Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K., 2003b. Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Ind. J. Exp. Biol.*, 41: 1160-1164.

Dey, B.K., 1988. Phosphate solubilizing organisms improving fertility status of soil. In :Sen, S.p., Palit, P. (Eds.). *Biofertilizers Potentialities and Problems. Plant Physiology Forum*, Naya Prokash, Calcutta, pp. 237-248.

Dreyfus, B., Garcia, J.L., and Gils, M., 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen.sp.nov., a stem nodulating fixng bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int.J. Syst.Bacteriol.* 38 (1): 89-98.

ENCARTA., 2005. Encyclopédie Encarta.

FAOSTAT 213-214: faostat3.fao.org/download/Q/QC/E

Figueiredo M.V.B, Martinez C.R, Burity H.A et Chanway C.P., 2008 b. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187-1193.

Giller, E. K., E. Witter, and S. P. Mc Grath., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol.Biochem.* 30, 1389-1414.

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

Haque, N.A. and Dave, S.R., 2005. Ecology of phosphate solubilizers in semi-arid agricultural soils. *Indian J Aiirobiol.*, 45: 27-32.

Hamadache A et Ait Abdallah F., 1998. Lutte contre les adventices en culture du Pois chiche d’hiver : un facteur déterminaat pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce .*céréaliculture* N°33 ISSN 1011-9582.

Halder, A.k., Mishra, A.K., Bhattacharya, p., Chakrabarthy, P.K., 1990. solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 36, 81-92.

Halder A.K., Chakrabarty P.K., 1990. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. Folia Microbiol.38:325–330.

ICRISAT.,2008. Poischiche. www.mapageweb.Umontreal.ca/bruneana/Simon/chapitre11 légumineuse pdf.webmaster-icrista@cgiar.org Chickpea consulté le 4/7/2008.

Illmer, P. and F. Schinner., 1992: Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated forest soils. Soil Biol. Biochem.24, 389-395.

Illmer, P. and E Schinner., 1995: Solubilization of inorganic calcium phosphates- Solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem.27, 257-263.

Jarvis BDW, van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M., 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 47:895-898.

Jimenez-Diaz, R. M. et A. Trapero-Casas., 1988. Improvement of chickpea resistance to wilt and root rot diseases. In: Proceeding on Present status and Future Prospects of Chickpea Crop production and Improvement in the Mediterranean Countnes, 11-13 Jul, Zagarozza. Spain.

Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME and Walker GC.,2007. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. Nat. Rev. Microbiol. 5(8), p619-633.

Jordan D.C., 1984. Family III. Rhizobiaceae. In Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol 1. Edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Williams & Wilkins., Baltimore, Ed., p243-256.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Jules Bouharmont., Kellogg, E.A., Stevens, P., 2001. Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

Kechache. K., 2005. Contribution à l'étude de l'effet de la fertilisation phosphate à base des engrais SSP 20% et TSP 46% sur le pois chiche mémoire de fin d'études.

Kinkle, B.K., J.S. Angle, and H. H. Keyser., 1987. Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Beadyrhizobium japonicum*. APPL. Environ. Microbiol.53, 315-319.

Lagrange A., 2010. Etudes écologique et microbiologique des espèces du genre *Costularia* (Cyperaceae), pionnières des sols ultramafiqes en Nouvelle-Calédonie : perspectives d'application à la restauration écologique. Doctorat en écologie et microbiologie, Université de Nouvelle Calédonie, Nouméa, 234p.

Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S., 2014. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. Microbiol Res .169:2–17.

- Laranjo M, Alexandre A, Rivas R, Velazquez E, Young JPW & Oliveira S., 2008.** Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 391–400.
- Laranjo M, Machado J, Young JPW & Oliveira S., 2004.** High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 101–107.
- Laranjo M, Young JPW, Oliveira S., 2012.** Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. *Syst Appl Microbiol* 35:359-367.
- Larrent J.P., Larrent M.G., 1985.** Manuel pratique de Microbiologie, Collection Hermann, Paris, France, p. 230.
- Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N., 2010 .** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism : the case of rhizobia. *Res. Microbiol*:161 : 453-463.
- Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G et Gresshoff P.M., 2009.** Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104: 277-285.
- Loynachan T., 2003.** Nitrogen fixation by forage legumes. Page Web visitée le 14 décembre 2003.
- Lupwayi, N. Z., Clayton, G. W., O'Donovan, J. T., Harker, K. N., Turkington, T. K. and Rice, W. A., 2004.** Decomposition of crop residues under conventional and zero tillage. *Can. J. Soil Sci.* 84: 403–410.
- Ma, L. J., Ohmert, I., and Vardanyan, V., 2011.** Allosteric features of KCNQ1 gating multigenesis. *Biophys. J.* 100, 885-894.
- Maheri-Sis1 N., Mohammad Chamanil, Ali-Asghar Sadeghil, Ali Mirza- Aghazadeh and Abolfazl Aghajanzadeh-Golshani., 2008.** Department of Animal science, Islamic Azad University-Science and Research Branche, Tehran, Iran.
- Malhotra, R. S, K. P. Pundir et A. E. Slinkard., 1987.** Genetic resources of chickpea. pp. 11-34 ZE: Saxena H. C. and K. B Singh. (eds). The Chickpea CAB International, Wallingford, U.K.
- Marie C., Broughton W.J. and Deakin W.J., 2001.** Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4: 336-342.
- Moulin L., Munve A., Dreyfus B., Boivin-Masson C., 2001.** Nodulation of legumes by members of β sub class of proteobacteria. *Nature*. 441 : 948 – 950.
- Murray L., Halligan S.L., Cooper P.J., 2010.** Effects of postnatal depression on mother–infant interactions, and child development. In: Wachs T., Bremner G., editors. Vol. 192–220. Wiley-Blackwell; (Handbook of Infant Development).

Nour SM, Cleyet-Marel J-C, Normand P, Fernandez MP.,1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 45:640-648.

Nour SM, Fernandez MP, Normand P, Cleyet-Marel J-C., 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int J Syst Bacteriol* 44:511-522.

Obaton M ., 1980. Activité nitrate réductase et nitrogénase en relation avec la photosynthèse et les facteurs de l'environnement. *Bulletin ASF*: 55-60.

Pacucci G., Troccoli C., et Leoni B., 2006. Supplementary Irrigation on Yield of Chickpea Genotypes in a Mediterranean Climate. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Manuscript LW 04 005. Vol. VIII. May, 2006.

Peix A, Rivas-Boyer AA, Mateos PF, Rodriguez-Barrueco C, Martinez-Molina E and Velazquez E., 2001. Soil Biol Biochem Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions.p:103-110.

Perry J.J., Staley J.J., Lory S., 2004. *Microbiologie : Cours et questions de révision*. Ed. Dunod. Paris. 891p.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Ahemad M, Oves M., 2009. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) *Microbial strategies for crop improvement*. Springer, Berlin, pp 105–132.

Kinkle, B.K., J.S.Angle, and H. H. Keyser., 1987. Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Beadyrrhizobium japonicum*. *APPL. Environ.Microbiol.*53, 315-319.

Ralston, D.B., and R.P.Mcbride., 1976. plant soil; Interaction of mineral phosphate-dissolving microbes with red pine seedlings.; pp: 493-507.

Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant. Sci*, 180:169-181.

Raven JA, Kuber JE and Beardall J., 2000. Put out the light. *J Mar Biol Assoen UK* 80:1-25.

Reddy, M. V. et K. B. Singh., 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. *Plants Dis.* 69: 900-901.

Rivas R, Laranjo M, Mateos PF, Oliveira S, Martinez-Molina E & Velazquez E (2007) Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett Appl Microbiol* 44: 412–418.

- Rivas R, Velazquez E, Willems A, Vizcaino N, Subba-Rao SN, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, Martinez-Molina E., 2002.** A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.F.) Druce. *Appl Environ Microbiol* 68:5217-5222.
- Ross, I. S., 1993.** Membrane transport processes and response to heavy metals. In *Stress Tolerance of Fungi*, ed. D. H. Jennings, pp: 97-125. Marcel Dekker, New York.
- Ross, S. M. and Kaye, K. J., 1994.** 'The Meaning of Metal Toxicity in Soil-plant Systems' in S. M. Ross (ed.), *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 27–62.
- Santos M.A., Nicola's M.F. and Hungria M., 2006.** Identification of QTL associated with the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* and soybean. *Pesq. Agrop. Bras.* 41: 67-75.
- Scheffer, Fand P.Schachtschabel., 1992.** *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- .Siddiqui,H., 2007.** Effect of phosphorus on growth and nodule formation of indigo plant under old himalyan piedmont field condition 2(6); p: 21-24.
- Silver, S., Phung, T., 2005.** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32 : 587-605.
- Singh F ., Diwakar B., 1995.** Chickpea Botany and Production Practices Skill Development Series no. 16-Training and Fellowships Program ICRISAT .Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India p: 4.6.7.
- Singhs, Kapoor KK.,1994.** Solubilization of insoluble phosphate isolated from different sources. *Environ Ecol* 12:51-55.
- Singh, K. B, H. C; Saena ET H. E ;Agridley., 1983.** Screening chickpea for cold tolerance and frost resistance. Zn: Workshop on Ascochyta blight and winter sowing of chickpea.
- Singhn.K; Handa A.K; Hasegawa P.M et Bressan R.A., 1987.** Characterisation of osmotin. *Plant physiology* 85:529-536.
- Sharma H.C., Sharma K.K. and Crouch J.H., 2004.** Genetic transformation of crops for insect resistance: Potential and limitations. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:47-72.
- Slim, N., B.Sifi, et S.Triki., 2006.** Criblage de variétés de pois chiche (*cicer arietinum L.*) pour la résistance au stress hydrique. In: *Gestion des Ressources et Applications Biotechnologiques en Aridoculture et cultures sahariennes: Perspectives pour la valorisation des potentialités du sahara*. séminaire International; Djerba; du 25 au 28 décembre 2006.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** *Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobia technology* .P.450. Springer-Verlag. New York.

Sulieman, S.A. and T.E.M. Hago., 2009. The effects of phosphorus and farmyard manure on nodulation.

Sulieman, S.A., 2002. The Response of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Phosphorus as Influenced by Farmyard manure. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Shambat, University of Khartoum, Sudan.

Tang, C., Hinsinger, P., Drevon, J.J., Jaillard ,B., 2001. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals Bot.*, 88.

Tinker PB.,1980.the role of rhizospheremicroorganisms in phosphorus Uptake by plants. In the Role of phosphorus in Agriculture.Eds.F Kwasaneh and E Sample.Madison: American Society of Agronomy,,P617-54.

Togay, Y., Togay, N., Dogan, Y., 2008 .recherches sur les effets du phosphore et de molybdène applications sur le rendement et les paramètres de rendement pour les lentilles (*Lens culinaris* Medic.)

Tomestt, A. B., 1993.Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi.In Stress Tolerance of fungi, ed. D. H. Jennings, pp: 69-95. Marcel Dekker, New York.

Trujillo ME, Willems A. Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludena D, Mateos PF, Martinez-Molina E, Velazquez E., (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobacirum lupine* sp. *Nov. Appl Environ Microbiol* 71:1318-1327.

Valverde A, Velazquez E, Fernandez-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Mates PF, Martinez-Molina E, Igual JM, Willens A., (2005).*Phyllobacterium trifolli* sp. *Nov.*, nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Micrbiol* 55:1985-1989.

Van Der Maesen L.J.G., 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea, p .11-34. In: Saxena, M.C. et Singh, K.B. (ed) the chickpea.

Vincent J.M., 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria.IBP. Handbook n°15 – Blackwell scientific publishers, Oxford.

Zaidi A, Kans MS, Ahmad M, Oves M., (2009).Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56:263-284.

Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schafer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G.S., Nekouei, M.K., and Buscot, F., (2010).Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation 202 to soil chemical properties and heavy metal contamination.*Environ Pollut*, 158(8), 2757-2765.

Wei G., Fan L., Zhu W., Fu Y., Yu J., Tang M., 2009. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR533-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials* 162 pp 50–56.

Wilson D. O., and H. M. Reiseanauer., 1970.Effect of Manganese and Zinc Ions on the Growth of Rhuzobium.J Bacteriol. 102, 729-732.

Zhang, J. J., Lou, K., Jin, X., Mao, P. H., Wang, E. T., Tian, C. F., Sui, X. H., Chen, W. F. & Chen, W. X., (2012).Distinctive Mesorhizobium populations associated with Cicer arietinum L. in alkaline soils of Xinjiang, China. Plant Soil 353, 123–134.

Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D .R., Shoemaker, R.C., 2005. Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics.Plant Physiology 137: 1189–1196.

Annexe

Annexe 1 : milieux de cultures et solutions nutritives utilisées

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

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

PH =6,8

Pour le YEM solide, ajouter 15g d'Agar par litre + Rouge Congo pour une concentration finale de 0,0025%.

Stériliser le milieu YEM par autoclavage à 121°C pendant 20mn.

Eau gélosée (0,7%)

Agar	0,7g
------	------

Milieu YAD(Rivas et al ,2006) en g/l

Extrait de levure	5g/l
Glucose	10g/l
TSP (triple super phosphate)Ca (H ₂ PO ₄) ₂ H ₂ O	2g/l
Agar	18g/l
Eaux distiller	1000ml

PH =6, 8

Milieu YAD (-) YAD absence de phosphate

Milieu YAD (+) le milieu YAD mais en remplace le TSP par KH₂PO₄ comme source de phosphate

Tryptone Yeats (TY) (Beringer, 1974) en g/l

Tryptone	5g/l
CaCl ₂	0,8g/l
Extrait de levure	3g/l
Agar	15g/l
Eau distillée	1000ml
PH =6, 8	

Solution nutritive (Vincent,1970)

Solution 1

CaCl₂ ,2H₂O Calcium (2M)

Solution 2

KH₂ PO₄(1M)

Solution3

MgSO₄ ,7H₂O (0,5M)

K₂SO₄ (0,5M)

MnSO₄ ,H₂O(0,002M)

SOLUTION4

H₃BO₃ (0,004M)

ZnSO₄, 7H₂O(0,001M)

CuSO₄,5H₂O (0,0004M)

CoSO₄, 7H₂O(0,0002M)

Na₂M_oO₂ , 2H₂O (0,0002M)

Solution 5

Ferric sodium (0,02M)

Prendre 0,5 ml de chaque solution (1 à 5) et les mélanger dans 800ml d'eau distillée.

Le pH doit être ajusté entre 6,6 et 6,8 avec du NaOH 1N. Compléter ensuite le volume jusqu'à 1000ml.

Pour la solution nutritive azotée, ajouter 0,7 g KNO₃ pour 1litre de solution nutritive

ANNEXE 2 : résultats

I-valorisation de l'effet de solubilisateur du phosphate bactérien sur la plante

Tableau 1 : TP1 avec azote sans P

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
5	34	0,6	1,3
10	37	1,1	2,4
6	47	0,9	1,8
6	26	0,8	0,3
8	46	0,8	3,4
6	36	1,4	0,8
5	42	1,4	1,6
7	37	0,3	0,3
12	36	1,4	1,7
9	36	1,6	1,3

Tableau 2 : TP2 avec azote +phosphate naturel

Pois.T	Pois.R	Longeure.T	Longeure.R
0,48	0,64	9	6
0,31	0,73	20	7
0,08	1,11	3,4	9,5
0,23	1,02	13	10
0,71	1,44	29	4
0,09	0,85	9	5
0,06	0,4	20	4
0,65	0,08	49	7
0,78	0,35	20	8
0,18	0,06	9	3,8

Tableau 3 : TP⁺ avec azote +phosphate libre (KH₂PO₄)

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
7	41	0,8	1,3
5	33	1	3,4
9	32	0,4	0,5
7	28	1,7	0,6
4	30	1	0,6
9	28	0,8	0,6
10	33	1,5	1,8
7	37	0,5	0,9
6	26	2,2	1,4
6	37	0,7	1,4

Tableau 4 : Bactérie 1(Sam76)

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
9	14	0,5	0,1
8	16	0,8	0
5	18	0,52	0,1
6	14	0,37	0,1
4	12	0,1	0,1
4	13	0,3	0,1
3	12	0,6	0,1
4	11	0,6	0,1
7	12	0,6	0,1
2	11	0,1	0,1

Tableau5: Bactérie 2 (Sam80)

longeure.R	longeure.T	Pois.R	Pois.T
4	16,5	0,3	0,1
4,4	8	0,8	0,1
9	23	0,9	0,3
4	21	0,1	0,4
4,9	21,5	0,4	0,6
7	22	0,6	0,2
7	28	0,7	1,1
4	19	0,9	0,3
7	29	0,7	0,6
8	26	0,3	0,4

Tableau 6 : Bactérie 3 (Sam131)

longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
4,5	13	0,1	0,3
7	24	0,7	0,1
3	0	0,4	0
6	25	0,5	0,4
4	10	1,1	0,4
7	23	1,6	0,6
12	33	1,1	0,5
3	25	0,8	0,4
7	12	0,8	0,7
2	5	0,9	0,1

Tableau 7 : B1+B2

Logeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
2	0	0,3	0
6	20	0,5	0,3
10	25	1	1
4	24	0,1	0,2
6	23	1,6	1
8	28	0,6	0,2
10	28	0,5	0,5
3	8	0,2	0
10	26	0,4	0,3
4	30	0,9	0,9

Tableau 8 : B1+B3

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
5	29	1,3	1,1
6	34	0,1	0,2
7	27	0,5	0,8
2	5	0,9	0,1
4	28	0,3	0,4
2,5	9	0,7	0,1
7	21	0,8	0,1
5	14	0,9	0,1
5	9	1,1	0,1
2	0	0	0

Tableau 9 : B2+B3

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
6	24	0,5	0,1
1	21	0,9	0,7
5	24	1,1	0,6
11	29	0,7	0,3
9	37	1	1
10	25	0,5	0,4
12	30	0,2	0,9
6	26	1	1
8	32	0,7	0,8
10	29	0,5	1,9

Tableau 10 : B1+B2+B3

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
12	21	0,9	0,1
5	20	1,1	0,5
0	0	0	0
5,5	24	1,7	0,9
10	23	1,1	0,3
4	22	0,5	0,8
6	29	0,9	0,1
6	18	1,4	0,4
6	18	0,6	0,6
6,5	16	0,8	0,2

II- Effet de l'inoculation et la Co-inoculation sur la tolérance au zinc chez *Cicer arietinum* en culture hydroponique

Tableau 1 : B1+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
6	8	0,2	0,3
19	4	0,3	0,2
14	5	0,1	0,1
6	5	0,1	0
2	2	0	0
5	0	0,1	0
12	5	0,1	0,1
5	0	0	0
3	0	0,1	0
0	0	0	0

Tableau 2 : B2+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
9,5	5	0,1	0,1
11	6	0,3	0,3
14	6	0,1	0,1
8	2	0,1	0
11	4	0,1	0
5	4	0	0
2,5	2	0	0
5	1	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Tableau3 : B3+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
13	4	0,4	0,1
13	13	0,2	0,3
5	6	0,2	0,1
8	5	0,2	0
4	2	0,2	0
3	0	0,1	0
2	1	0,1	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Tableau 4 : B1+B2+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
4	10	0	0,1
10	6	0,3	0,2
11	3	0,1	0,2
7	7	0,1	0,2
11	0	0,1	0
1	0	0	0
2	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Tableau 5 : B1+B3+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
9	0	0,2	0
1	0	0,1	0
12	0	0	0
8	0	0,1	0
4	0	0	0
1	0	0	0
2	0	0	0
1	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Tableau 6 : B2+B3+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
9	0	0,2	0
2	1	0	0
8	7	0	0,1
1	0	0	0
3	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Tableau 7 : B1+B2+B3+ la CMI en Zinc

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
4	3	0	0
6	6	0,1	0
8	4	0,2	0,2
3	4	0	0
1	5	0	0,1
5	5	0,1	0,1
0	4	0	0
0	5	0	0
0	3	0	0
0	0	0	0

Tableau 8 :Contrôle négatif (sans Zinc)

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
21	23,5	0,9	0,4
28	27	0,9	0,9
21,5	21	0,5	0,8
19	24,2	0,5	0,7
20	23,5	0,3	0,5
15	23	0,6	1
15	19	0,3	0,4
16	17	0,6	0,4
0	0	0	0
0	0	0	0

Tableau 9 : Contrôle positif (avec la CMI en Zinc)

Longeure.R	Longeure.T	Pois.R	Pois.T
2	8	0	0
6	0	0,1	0
2	0	0	0
8	7	0,2	0,2
4	2	0	0
12	2	0,2	0
13	0	0	0
1	6	0,1	0,1
0	0	0	0
0	0	0	0

Etude de l'antagonisme entre certaines espèces du *Mesorhizobium* nodulaires et leur effet sur l'alimentation phosphaté et sur l'amélioration de tolérance pour Zinc du pois chiche

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

Résumé:

Cette étude vise à examiner trois souches (B1, B2 et B3), nodulaires du pois chiche (*Cicer arietinum*), pour leur activités biologiques concernant la solubilisation du phosphate, la tolérance pour le Zinc in vitro ainsi que d'évaluer l'effet de ces capacités sur la croissance du pois chiche. Le critère de sélection des souches In vitro pour le cas de solubilisation de phosphate, était basé sur le diamètre de l'halot entourant les colonies sur le milieu YAD supplémenté de Triple Super Phosphate (TSP) et sur l'absence et la présence des colonies sur milieu TY supplémenté par différentes concentrations de Zinc, dans le cas de tolérance au Zinc. L'inoculation et la co-inoculation bactérienne du pois chiche, sont réalisés sur pots de sable dans le cas de phosphate et sur culture hydroponique pour le cas du Zinc. Les résultats montrent que In vitro, B2 est la plus solubilisante du phosphate alors que B1 est la plus intéressante pour la tolérance au Zinc. L'inoculation et la co inoculation bactérienne du pois chiche ont permis de classer selon leur fiabilité dans la solubilisation du phosphate les inoculum en B1, B2, B3 comme inoculum simple et B1+B2, B1+B3, B2+B3, B1+B2+B3 comme inoculum mixte. L'effet des différents inoculums est trouvé non significatif dans le cas d'amélioration de tolérance du pois chiche au Zinc. Ainsi les résultats sont promoteurs pour le cas de solubilisation du phosphate et permettent de classer nos bactéries parmi les PGPR (Plant Growth Promouvoir Rhizobacteria). Un test avec une concentration en Zinc, située entre la CMI du pois chiche et 400µM permettrait de vérifier l'effet de nos bactéries sur le pois chiche pour améliorer sa tolérance en Zinc.

Mots clés : *Mesorhizobium*, *Cicer arietinum*, phosphate, Zinc ; inoculation**Laboratoire de recherche :** Biotechnologie

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme.GUERGOURI I. (M.A.A - UFM Constantine),
Rapporteur : Mlle.DEKKICHE S (Université Hadj Lakhdar Batna),
Examineur : M.CHABBI R (M.A.A- UFM Constantine).

Date de soutenance : 14/06/2016