

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université 08 Mai 1945-Guelma

Faculté de science et L'ingénierie

Département de biologie



مذكرة

Mémoire Master

Domaine : Science de la nature et de vie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Option : biologie moléculaire de procaryotes

**Thème : Caractérisations phénotypiques de rhizobia  
nodulant *Cicer arietinum*. L (Pois chiche).**

**Présenter par :**

- KADDOUR Farida.
- MAIZI Fatima Zohra.
- SELATNI Safia.

**Membres de jury :**

**Président :** BENOURETH Djamel Eddine, Professeur, Univ Guelma

**Directeur :** RAHMANI BOUABIDE Rima, M. A, Univ Guelma.

**Examineur:** DAFRIAYAD Hayat, M. A, Univ Guelma.

- Juin 2010-

## **Remerciement :**

*La rédaction d'un mémoire est toujours une tâche longue et souvent difficile. Il est pourtant une page facile à écrire, la première où il est possible de remercier tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce mémoire. Qu'ils nous pardonnent si on ne puisse les citer tous ici.*

*Nous tenons à exprimer tout d'abord nos remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail ; Mr. le professeur **BENOUARETH Djamel Eddine** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire; Mm. Maitre assistante **DAFRI AYAD Hayat** qui a accepté d'examiner notre travail.*

*Merci a Vous*

*Nous voudrions adresser toute nos reconnaissances à nos directrice de mémoire Mm. Maitre assistante **RAHMANI BOUABIDE Rima**. Merci de nous avoir accueillies dans ton équipe, merci de nous avoir transmis ta capacité d'enthousiasme et ta force, merci de nous avoir offert cette grande liberté de travail et de nous avoir accordée ta confiance. Nous avons énormément appris de vous et nous garderons longtemps le souvenir de ton enseignement et de ton humanité.*

*Merci a Vous*

*Merci à tout les personnes de département de biologie, en particulier le chef département **Mr. Kachi Soliman** et l'adjoint **Mr. GHRIEB Lassaad**.*

*Un grand remerciement à tout le personnel technique du laboratoire de microbiologie et de biochimie, en particulier à Mme **HOURIA**.*

*A nos camarades de deuxième année master option BMP ; Hanane, Samiha, Mona, Djennet, Meriem, Issma, Khadija, Halima.*

# Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction**

## **Chapitre I : Étude bibliographiques**

**I -Le cycle de l'azote**

1- Généralités.....	3
2- La fixation biologique de l'azote .....	3
2-1-Mécanisme de la fixation biologique de l'azote .....	5
2-2 -La fixation non symbiotique (libre) de l'azote .....	9
2-3- Fixation symbiotique de l'azote .....	10

**II- Symbiose rhizobia-légumineuse**

1 -Macro-symbiote : les légumineuses .....	10
1-1- Généralités .....	10
1- 2-Pois chiche.....	11
2- Micro-symbiote (les Rhizobiums).....	13
2-1- Définition .....	13
2-2- Taxonomie des rhizobiums .....	13
2-3- Caractéristiques des Rhizobia .....	14

**III. Nodulation**

1. Processus de formation d'un nodule .....	16
1.1. Attachement des bactéries .....	17
1.2. Déformation du poil absorbant .....	17

1.3. Formation du primordium nodulaire .....	17
1.4. Développement du nodule.....	18
1.5. Fonctionnement du nodule.....	19
<b>VI. Interaction moléculaires rhizobium/légumineuses</b>	
1. Excrétion des flavonoïdes .....	20
2. Production des facteurs Nod .....	21

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

### **I –Matériels**

1-Matériel végétal.....	22
2-Les milieux de culture.....	23
3-Les solutions d'arrosage.....	23

### **II-Méthodes**

1- Collecte des nodules .....	23
2- Préparation de la suspension bactérienne.....	24
2-1- Stérilisation de la surface nodulaire.....	24
2-2- Écrasement des nodules .....	25
3- Isolement des souches de rhizobia .....	25
3-1- Coloration a la fuchsine .....	25
3-2- Conservation des isolats .....	25
4-Étude des caractères phénotypiques des isolats .....	27
4-1- Étude des caractères culturaux .....	27
4-2-Études des caractères microscopiques.....	27

4-3- Étude des critères physiologiques .....	28
4-4- Les critères biochimiques : .....	29
5- Étude de l'infectivité.....	29
6- Conservation des souches nodulantes .....	32

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

1- Isolement des rhizobia.....	33
2- Étude des caractères culturels des isolats.....	33
2-1- Sur milieu YEMA additionné de rouge de Congo.....	33
2-2- Sur milieu YEMA additionné de bleu de bromothymol.....	33
3- Étude des caractères microscopiques.....	35
4- Étude des critères physiologiques.....	37
5- Critères biochimiques.....	42
6- Étude de l'infectivité des isolats.....	42

### **Conclusion et perspectives**

### **Résumé**

### **Annexes**

### **Références bibliographiques**

### Liste des abréviations:

<b>Al</b>	<b>Aluminium.</b>
<b>AMX</b>	<b>Amoxiciline.</b>
<b>BTB</b>	<b>Bleu de bromothymol.</b>
<b>CAP</b>	<b>Acide caprique.</b>
<b>Co</b>	<b>Cobalt.</b>
<b>Cu</b>	<b>Cuivre.</b>
<b>DO</b>	<b>Densité Optique.</b>
<b>E</b>	<b>Erythromycine.</b>
<b>GGs</b>	<b>Glutamine Synthétase.</b>
<b>GLY</b>	<b>Glycérol.</b>
<b>GOGAT</b>	<b>Glutamine-2-oxoglutarate-amino-transférase.</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>eau oxygénée.</b>
<b>HCl</b>	<b>Acide chlorhydrique.</b>
<b>ITGC</b>	<b>Institute Technique des Grandes Cultures.</b>
<b>N<sub>2</sub></b>	<b>Nitrogène.</b>
<b>NaCl</b>	<b>Chlorure de sodium.</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hydroxyde de sodium.</b>
<b>NH<sub>3</sub></b>	<b>Ammoniac.</b>
<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>Nitrate.</b>
<b>nod</b>	<b>Gènes de nodulation.</b>
<b>Nod</b>	<b>facteur de nodulation.</b>
<b>MH</b>	<b>Muller Hinton.</b>
<b>min</b>	<b>minutes.</b>
<b>mM</b>	<b>milli Molaire.</b>
<b>P</b>	<b>Péniciline.</b>
<b>Pb</b>	<b>plomb.</b>
<b>PT</b>	<b>Pristinamycine.</b>
<b>SSS</b>	<b>Sulfamide.</b>
<b>YEMA</b>	<b>Yeast Extract Mannitol Agar.</b>
<b>YMB</b>	<b>Yesat Mannitol Broth.</b>
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>Chlorure de Zinc.</b>

## Liste des figures :

<b>Figure 1 :</b> le cycle de l'azote .....	4
<b>Figure 2:</b> Structure de la nitrogénase .....	7
<b>Figure 3 :</b> Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote en ammoniacque .....	8
<b>Figure 4 :</b> Cycle Glutamine synthétase/ Glutamine – Oxoglutarate Aminotransférase .....	9
<b>Figure 5 :</b> le plant de pois chiche ( <i>Cicer arietinum</i> L).....	12
<b>Figure 6 :</b> les graines de pois chiche ( <i>Cicer arietinum</i> L).....	12
<b>Figure 7 :</b> L'adhésion des bactéries à la surface des cellules des poils absorbants.....	17
<b>Figure 8 :</b> la formation de cordon d'infection.....	18
<b>Figure 9 :</b> types nodulaires chez les légumineuses.....	19
<b>Figure10 :</b> aspects des bactéroïdes.....	19
<b>Figure 11 :</b> Nodule fixateur d'azote de couleur rose .....	20
<b>Figure 12 :</b> exemple de structures chimiques de flavonoïdes.....	21
<b>Figure 13 :</b> Schéma représentant le dialogue moléculaire.....	21
<b>Figure 14:</b> les nodules de pois chiche.....	22
<b>Figure 15 :</b> graine de <i>Cicer arietinum</i> L.; cultivar FLIP 90-13.....	22
<b>Figure 16:</b> stérilisation de la surface nodulaire.....	24
<b>Figure 17:</b> technique d'isolement des rhizobia.....	26
<b>Figure 18:</b> germination des graines de pois chiches.....	30
<b>Figure 19 :</b> semis des graines.....	31
<b>Figure 20 :</b> inoculation des graines.....	32
<b>Figure 21 :</b> exposition de la culture à la lumière du jour.....	32
<b>Figure 22 :</b> aspect cultural des souches isolées.....	34
<b>Figure 23:</b> acidification et alcalinisation des souches nodulant le <i>Cicer arietinum</i> L.....	35
<b>Figure 24 :</b> aspects microscopiques des isolats .....	36
<b>Figure 25 :</b> effet du pH sur la croissance des isolats de <i>Cicer arietinum</i> L. ....	37
<b>Figure 26 :</b> effet de température sur la croissance des souches nodulant le <i>Cicer arietinum</i> .....	38
<b>Figure 27 :</b> effet de salinité (NaCl) sur la croissance des souches nodulant le <i>Cicer arietinum</i> L..	39
<b>Figure 28 :</b> effet des antibiotiques sur la croissance des isolats .....	40
<b>Figure29:</b> résultats d'antibiogramme des souches 5 et 10.....	41
<b>Figure 30:</b> effet des métaux lourds sur la croissance des isolats.....	41
<b>Figure 31:</b> le système racinaire de plant témoin dépourvu de nodules.....	44
<b>Figure 32:</b> l'aspect des nodules induit par les souches nodulantes .....	45

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1 :</b> Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote.....	6
<b>Tableau 2 :</b> Classification actuelle des Rhizobiums.....	15
<b>Tableau 3 :</b> les étapes de coloration de Gram.....	27
<b>Tableau 4:</b> longueur et largeur des bâtonnets isolés.....	36
<b>Tableau 5 :</b> Les résultats de la mise en évidence de l'oxydase et la catalase.....	42
<b>Tableau 6 :</b> nombre aspect et diamètre des nodules induits par les isolats .....	43

Produced with ScanTopDF

---

---

## Introduction :

Le sol constitue un support pour différents cycles d'échanges d'énergie et de transfert de substances entre les différentes entités qui l'abritent. Un des cycles les plus importants est le cycle de l'azote.

Parmi les éléments nutritifs essentiels, l'azote est élément nutritif essentiel très important puisqu'il est nécessaire à la fois aux biosynthèses des acides aminés et au métabolisme des plantes. Seul l'azote combiné sous forme de nitrate ou d'ammoniaque est assimilable par la plante. Les sources naturelles d'azote combiné sont les éclairs, la décomposition d'organismes vivants, les cyanobactéries présentes dans l'environnement proche des plantes et enfin, la plus importante des sources, les bactéries de type *Rhizobia* qui entrent en symbiose avec les légumineuses (Ghataigne G, 2007).

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une légumineuse à graines largement cultivée dans le monde et occupe la seconde place, après le pois (*Pisum sativum* L.), dans l'alimentation humaine (Gordan, 2002).

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

Pour le bon fonctionnement de la symbiose rhizobia - *Cicer arietinum* L., une bonne synergie entre les deux partenaires symbiotiques et les facteurs édapho-climatiques du milieu est indispensable. Il est donc primordial d'identifier en premier lieu les rhizobia autochtones nouvellement isolés puis sélectionner ceux qui peuvent survivre et maintenir une haute performance symbiotique sous les différentes contraintes de l'environnement.

La caractérisation phénotypique des souches nodulant le *Cicer arietinum* L. nous permettra d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu. En effet, les facteurs environnementaux affectent tous les aspects de la fixation symbiotique d'azote. Parmi les facteurs les plus importants figurent le pH, la salinité et la température.

---

---

Dans cette optique, l'étude porte sur la détermination des caractéristiques phénotypiques des souches. L'ensemble de ces caractères pourra constituer une base pour l'établissement de stratégies d'inoculations dans différentes régions du pays mais aussi une base d'étude de la diversité phénotypique qui existe entre ces souches autochtones.

L'analyse de leur tolérance à la salinité, aux températures élevées, aux pH acides et alcalins, aux antibiotiques, aux métaux lourds ainsi que leurs caractéristiques symbiotiques et culturales ont permis de mettre en évidence une large diversité physiologique au sein de ces populations de rhizobium nodulant le pois chiche.

Vu son intérêt nutritionnel et agronomique, une meilleure connaissance des rhizobia nodulant le pois chiche dans le sol algérien, permet l'amélioration du rendement de cette légumineuse. Pour cela nous nous sommes intéressés à l'étude des rhizobia nodulant une variété de pois chiche ; FLIP 90-13, cultivée à l'institut technique des grandes cultures (ITGC) de la wilaya de Guelma.

Dans le cadre du travail relatif à ce mémoire, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- La collecte de plantes nodulées afin de pouvoir constituer une collection de symbiontes nodulant le pois chiche de la variété FLIP 90-13.
- Étudier l'infectivité des isolats de pois chiche.
- La caractérisation phénotypique des souches de la collection afin d'évaluer leur diversité en vue de sélectionner les souches les plus performantes pour des applications potentielles.



***Chapitre I :***  
***Étude***  
***bibliographique***

## I - Le cycle de l'azote :

### **I-1- Généralités :**

L'azote total est généralement réparti dans trois ensembles principaux, constitués par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins W.G, 2003).

Au cours de son cycle, l'azote suit différentes transformations représentées dans la figure 1. Ces transformations de l'azote sont réalisées par :

1. Les plantes qui produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions  $\text{NO}_3^-$  puisés dans le sol.
2. Les animaux qui utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Par exemple, les protéines de la viande sont produites à partir des acides aminés d'origine végétale.
3. Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) qui transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions  $\text{NH}_4^+$ .
4. D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le  $\text{NH}_4^+$  en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion  $\text{NH}_4^+$  qui se forme directement à partir d'ammoniac (Site web N° 1).

### **I- 2- La fixation biologique de l'azote :**

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse par les organismes photosynthétiques (Roger P *et al.*, 1996).

Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Par comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an (Roger P *et al.*, 1996).

Le rôle des micro-organismes dans ce phénomène a été reconnu en 1888 par Hellriegel et Wilfert. Ces derniers ont constaté que des légumineuses ayant des nodules symbiotiques étaient capables d'incorporer l'azote moléculaire. Par la suite, en 1901, Beijerinck, a découvert la fixation de l'azote par les bactéries libres (Roger P *et al.*, 1996).

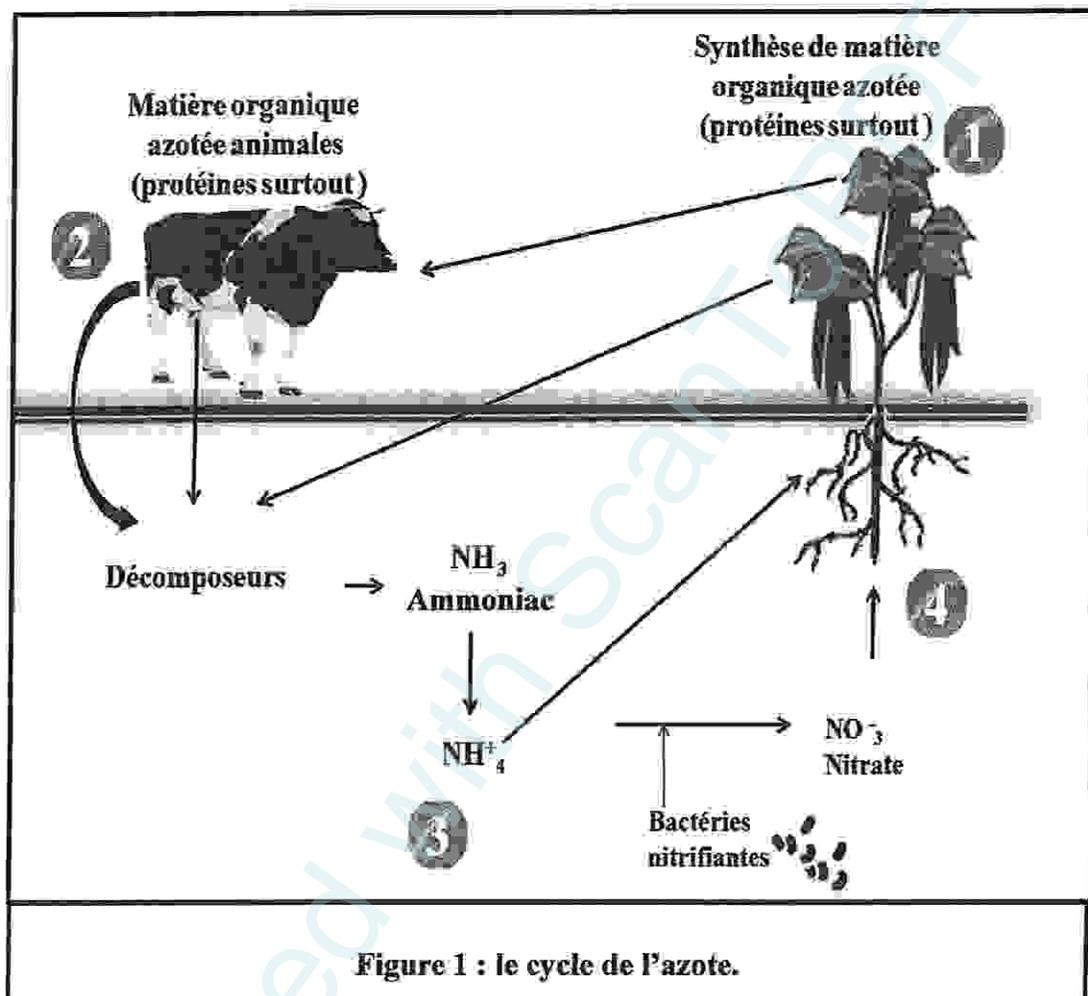


Figure 1 : le cycle de l'azote.

La fixation biologique de l'azote est en fait un processus biochimique et physiologique complexe ; Elle relève uniquement du domaine des procaryotes. Les procaryotes qui fixent l'azote nommés fixateurs d'azote, comprennent à la fois des organismes libres et des organismes, qui forment des associations symbiotiques avec d'autres organismes (Hopkins W.G., 2003).

Depuis, de nombreux genres bactériens ont été reconnus comme fixateurs. Ces genres représentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-microorganisme (Tableau 1), les relations avec l'oxygène et les modes trophiques (Roger P *et al.*, 1996).

La fixation biologique de l'azote marque un point déterminant dans le domaine de la production agricole. Sa compréhension a été perçue comme un grand évènement scientifique. Elle est envisagée pour procurer des économies dans la pratique de la fertilisation.

Elle semble correspondre à une sorte d'alternative aux producteurs des pays en voie de développement souffrant d'un accès limité aux intrants. Pour certains auteurs, la fixation biologique de l'azote est la seule et unique alternative pour l'augmentation croissante du coût des engrais sans perte de rendement.

Malgré tout, la fixation biologique de l'azote est un domaine de recherche encore vaste dans lequel de nombreux chercheurs et équipes de chercheurs travaillent activement. (Bogusz D, 1985).

### 2-1-Mécanisme de la fixation biologique de l'azote :

L'azote est un des éléments les plus importants pour la vie des plantes. Toutefois, la plupart d'entre elles n'utilisent que l'azote combiné avec d'autres atomes tels ammoniums et les nitrates.

Pourtant, la plus grande concentration d'azote sur terre est celle de l'atmosphère (environ 80%). Certes, il existe des processus naturels qui permettent de tirer profit de cette importante source et de combler d'une façon naturelle les pertes dues aux conditions actuelles de production (lessivage, dénitrification ...). Cette restitution sur terre se réalise suivant des voies physiques ou biologiques. Le mécanisme biologique de cette restitution est la réduction de l'azote moléculaire par les bactéries (symbiotique, associative ou libre) par l'action d'une enzyme : la nitrogénase. (Peret B, 2007).

#### 2.1.1. Structure de la nitrogénase :

La nitrogénase est l'enzyme connue chez les fixateurs et intervenant dans la fixation biologique de l'azote. C'est un complexe enzymatique formé de deux métalloprotéines (Eady, 1986 ; Dean *et al.*, 1993). Les deux métalloprotéines composant la nitrogénase sont le plus souvent appelées protéine I et protéine II.

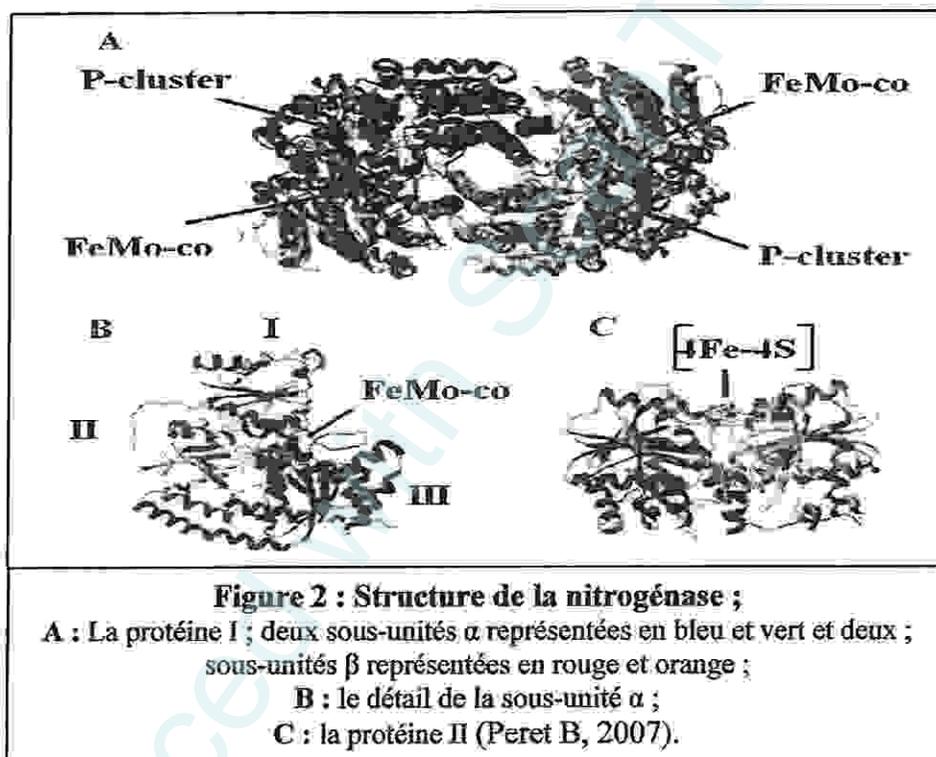
- **La protéine I** : est un hétérotétramère, formé de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$ , de masses molaires voisines (Eady, 1986 ; Newton, 1993). C'est la protéine I qui contient le cofacteur à fer et à molybdène appelé : MoFe-protéine ou dinitrogénase ; au niveau de la quel l'azote moléculaire est réduit en ammoniaque.

**Tableau 1 : Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote**  
(Bogusz, D, 1985).

Micro-organismes libres	
• Aérobie	
• Hétérotrophes	<i>Azotobacter spp.</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Beijerinckia indica</i> ; <i>Azospirillum lipoferum</i>
• Phototrophes	Cyanobactéries
• Hétérocystées	<i>Nostoc</i> ; <i>Anabaena</i> ; <i>Calothrix</i> ; <i>Tolypothrix</i>
• Homocystées	<i>Trichodesmium</i> ; <i>Oscillatoria</i>
• Unicellulaires	<i>Gloeotheca</i> ; <i>Gloeocapsa</i>
• Anaérobies	
• Hétérotrophes	<i>Clostridium pasteurianum</i> ; <i>Desulfovibrio vulgaris</i> ; <i>Desulfotomaculum spp.</i> ; <i>Methanobacterium spp.</i>
• Phototrophes	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ; <i>Rhodobacter capsulata</i> ; <i>Chromatium vinosum</i>
Micro-organismes symbiotiques	
• Légumineuses	
• à nodules racinaires	<i>Rhizobium meliloti</i> ; <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ; <i>Sinorhizobium fredii</i>
• à nodules caulinaires	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
• Symbioses actinorhiziennes	<i>Franki</i>
• Symbioses à cyanobactéries	
• Azolla	<i>Anabaena azollae</i>
• Cycas	<i>Anabaena cycadeae</i>
• Lichens	<i>Nostoc</i>
• Mousses et hépatiques	<i>Nostoc</i>

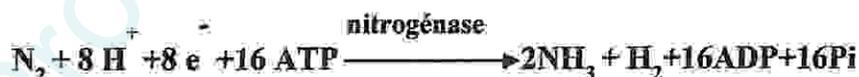
- **La protéine II** est un homodimère, formé de deux sous-unités identiques reliées par un groupement prosthétique unique 4Fe-4S (Eady, 1986 ; Newton, 1993 ; Dean *et al.*, 1993). Elle est aussi appelée : dinitrogénase réductase ; car elle transfère un électron à la protéine I, en présence d'ATP (voir Figure 2).

Chaque composante de la nitrogénase est en fait une protéine contenant du fer (Fe) et du soufre (S) et pouvant comporter un site porteur d'électrons. La dinitrogénase réductase ne peut transporter qu'un électron à la fois. Ainsi, on pense qu'elle sert probablement à l'emmagasinage temporaire de l'électron. Par contre, la dinitrogénase comporte deux autres sites métalliques (FeMoCo) qui sont considérés comme les véritables sites de la fixation d'azote (Peret .B, 2007).



### 2.1.2. Processus de la réduction de l'azote :

La réaction de base est la suivante :

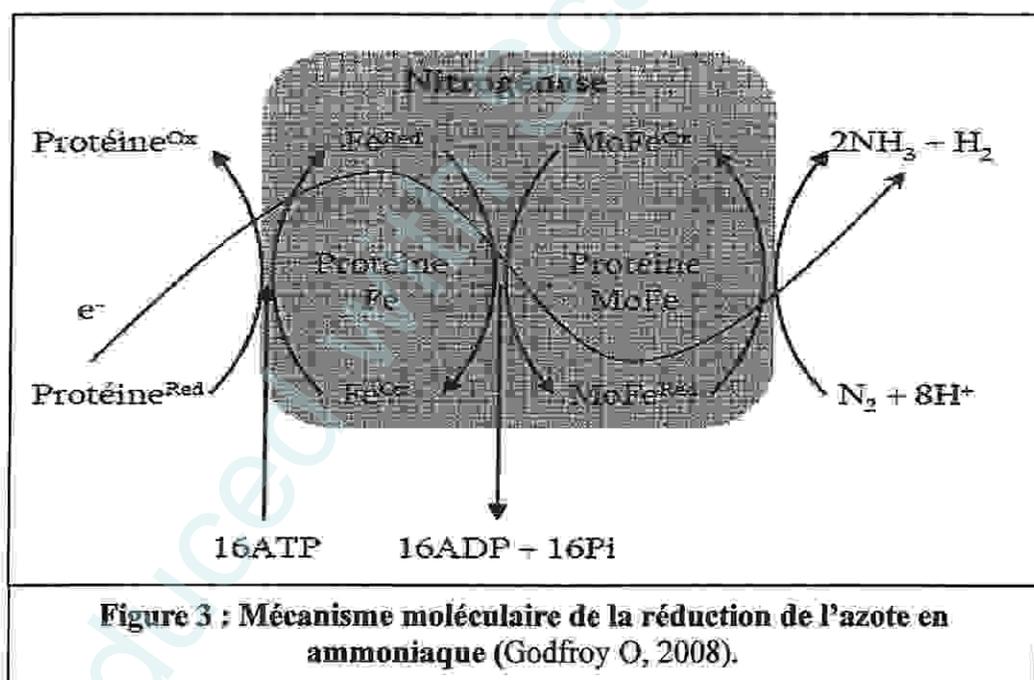


L'azote est d'abord réduit en ammoniac. Ce dernier sera mis à disposition de la plante (cas des bactéries symbiotiques) ou utilisé par les microorganismes et libéré après (cas des fixateurs libres). Cette réaction nécessite de l'énergie que les bactéries reçoivent de la plante hôte (cas de la symbiose), ou qu'elles tirent à partir de l'oxydation des exsudats racinaires ou des substrats carbonés présents dans le sol.

La fixation débute avec l'acquisition d'électrons par la dinitrogénase réductase (voir figure 3), à partir d'un donneur d'électrons (Godfroy O, 2008).

En général, ces donneurs font partie du groupe des ferredoxines ou flavodoxines. Les premiers sont des protéines comportant des sites capables de transférer un électron à chaque fois, alors que les derniers sont capables de transférer deux électrons. Ces électrons sont ensuite fournis à la dinitrogénase réductase et transférés à la dinitrogénase avec une hydrolyse parallèle d'ATP en ADP (Godfroy O, 2008).

Cette dernière réaction fournit l'énergie nécessaire à la fixation biologique de l'azote. Ce transfert d'électrons s'accompagne normalement d'un autre concernant les protons (d'après la réaction de base). Il faut en effet un nombre égal de protons et d'électrons pour aboutir aux résultats de la fixation. La provenance réelle de ces protons est encore mal connue (Godfroy O, 2008).



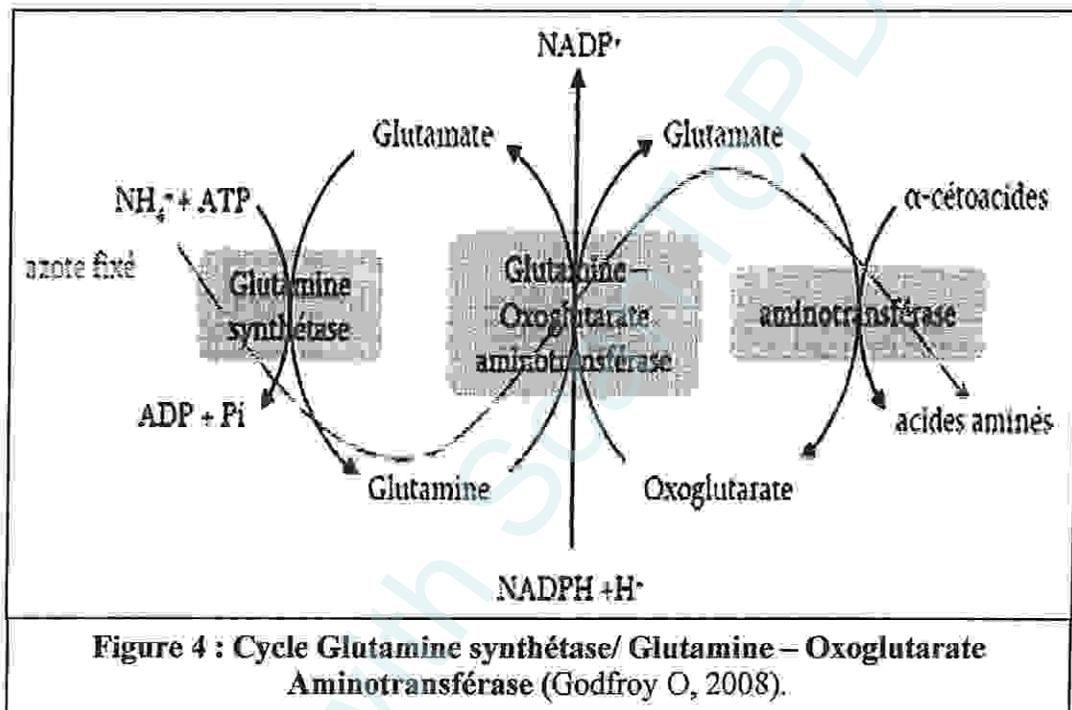
### 2.1.3. Le métabolisme de l'azote fixé :

La fixation d'azote aboutit en premier lieu à la formation de l'ammoniac. Puis, ce dernier intègre le métabolisme de la plante et s'incorpore dans l'acide glutamique par l'intervention de la glutamine synthétase (GS). Cette réaction s'accompagne d'une hydrolyse parallèle d'ATP (Figure 4).

La glutamine ainsi formée sert pour l'amination d'alpha-cétoglutarate. Cette dernière réaction est sous contrôle de la glutamine-2-oxoglutarate-amino-transférase (GOGAT), Deux

moles de glutamates sont produites et peuvent être réutilisées soit dans la formation de glutamine, soit dans d'autres réactions métaboliques.

L'ammoniac est alors exporté vers la cellule de la plante hôte, en vue d'une incorporation avec la GS et la GOGAT. Par la suite, l'azote fixé est acheminé dans les différentes parties de la plante par des transporteurs du groupe des amides (asparagine, glutamine ...) (Godfroy O, 2008).



### I-2 -2 -La fixation non symbiotique (libre) de l'azote :

Les bactéries libres fixatrices d'azote, sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux. Bien que certaines espèces soient aérobies (Par ex. *Azotobacter*, *Beijerinckia*), la plupart d'entre elles ne fixent l'azote que dans des conditions anaérobies ou dans des conditions des très faibles pressions partielles d'oxygène (conditions dites des micro-aérophylie).

Elles comprennent des genres non photosynthétiques (*Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*) et des genres photosynthétiques (*Chromatium*, *Rhodospirillum*).

En plus de ces bactéries, plusieurs genres de cyanobactéries (principalement *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbia*, *Calothrix*) comprennent des espèces fixatrices d'azote.

Bien que les organismes libres, fixateurs d'azote soient très répandus, la plupart ont une croissance lente et, exceptées les espèces photosynthétiques, ils ont tendance à être confinés dans les habitats riches en carbone organique comme une proportion importante de

leur énergie respiratoire est nécessaire pour fixer l'azote, la part disponible pour leur croissance est moindre (Hopkins G, 2003).

### **I-2-3- Fixation symbiotique de l'azote :**

Même si dans le langage courant, on dit que les plantes se nourrissent d'azote, (mais aussi de phosphore et de potasse) jamais aucune plante n'a pu vivre à partir d'azote atmosphérique. Ce sont les ions nitrates et nitriques qui sont absorbés par les plantes.

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote atmosphérique sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes du groupe « rhizobia » et les légumineuses.

Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote (Hopkins G, 2003).

## **II- Symbiose rhizobia-légumineuse :**

La symbiose signifie littéralement « vie en commun » (Peduzzi, R et Rodoni, R.B, 2001) est interaction qui peut se faire entre d'une part, la bactérie qui fixe l'azote atmosphérique et le fournit à la plante hôte sous forme assimilable et d'autre part, la plante hôte qui procure à la bactérie un micro-habitat favorable (Dommergues *et al.*, 1999).

### **II- 1 -Macro-symbiote : les légumineuses**

#### **1-1- Généralités :**

Les légumineuses constituant la famille des *Fabaceae* sont définies par leur structure florale spécifique, la cosse de leur fruit. Ces plantes viennent en deuxième rang après les graminées pour la satisfaction des besoins alimentaires de l'homme

Les légumineuses comptent 670 à 750 genres et 18000 à 19000 espèces différentes (Djebali N, 2008).

Deux groupes de légumineuses peuvent être distingués :

- ❖ **Les légumineuses fourragères :** qui sont cultivées essentiellement pour leur système végétatif, producteur de matière verte (luzerne, trèfle...) (Aveline A *et al.*, 1999).
- ❖ **Les légumineuses à graines :** qui sont cultivées principalement pour leurs graines riches en protéines utilisées soit pour l'alimentation humaine (arachide, fève, haricot, lentille, petit pois, pois chiche, soja), soit pour l'alimentation animale (féverole, lupin, pois protéagineux, soja) ; elles sont parfois utilisées en vert au début de la formation des graines (Aveline A *et al.*, 1999).

## 1- 2-Pois chiche :

Le *Cicer arietinum* L. (pois chiche) est une plante de la famille des Fabacées, voisine du petit pois mais d'un genre botanique différent. Il est cultivé dans les régions méditerranéennes et produit une graine comestible (Site Web N° 2).

### 1. 2. 1. Historique :

Le pois chiche est probablement originaire du Proche-Orient (Sud-Est de la Turquie, Syrie), il est arrivé en Inde il y a seulement deux siècles en passant d'abord par l'Afghanistan. Le nom hindi des pois chiche est *Kabuli chana* (chana = pois chiche) (Site Web N°2). Des traces de pois chiches ont été trouvées dans le sud de la France datant de 9000 ans. On ignore cependant s'il s'agissait de plantes à l'état sauvage ou d'agriculture. On sait par contre qu'ils étaient cultivés voilà 5000 ans dans le bassin méditerranéen. En Inde, les traces de culture datent de 4000 ans (Site Web N°3).

### 1. 2. 2. Taxinomie et description de la plante :

Sur le plan taxonomique, le pois chiche appartient à la famille des Fabaceae, sous-famille Faboideae, genre *Cicer* et espèce *Cicer arietinum* L. (Spichiger et al., 2002). Il s'agit d'une plante herbacée annuelle, dressée ou rampante couverte de poils glanduleux. Sa germination est du type hypogé (les cotylédons restent souterrains). Ses racines peuvent atteindre un mètre de profondeur, mais la plupart se trouvent dans les premiers centimètres (Melakhessou Z, 2007).

- Sa tige anguleuse a une hauteur de 0.20 à 1 mètre de haut (figure 5 ; A).
- Ses feuilles se composent de 7 à 17 folioles ovales et dentées (figure 5; B) .
- Les fleurs peuvent être blanches (figure 8 : C-1), bleues ou violettes (figure 5 : C-2) ; solitaires et pédonculées.
- Les gousses sont renflées à 1-2 graines presque rondes (figure 5; D). (Vander Maessen L.J.C, 1972).

Selon la taille et la couleur des graines, on distingue deux types de pois chiche :

- ❖ **Le kabuli** : autres noms ; Garbanzo, Channa, Bengal gram ; variété à grosse graine (calibre des grains : 7-10 mm) de couleur crème et recouvert d'un tégument mince (Figure 6 ; a).
- ❖ **Le Desi** : autres noms ; Kala channa ; plus petit, plus foncé et recouvert d'un tégument épais (Figure 6 ; b) (Gordon, 2002).

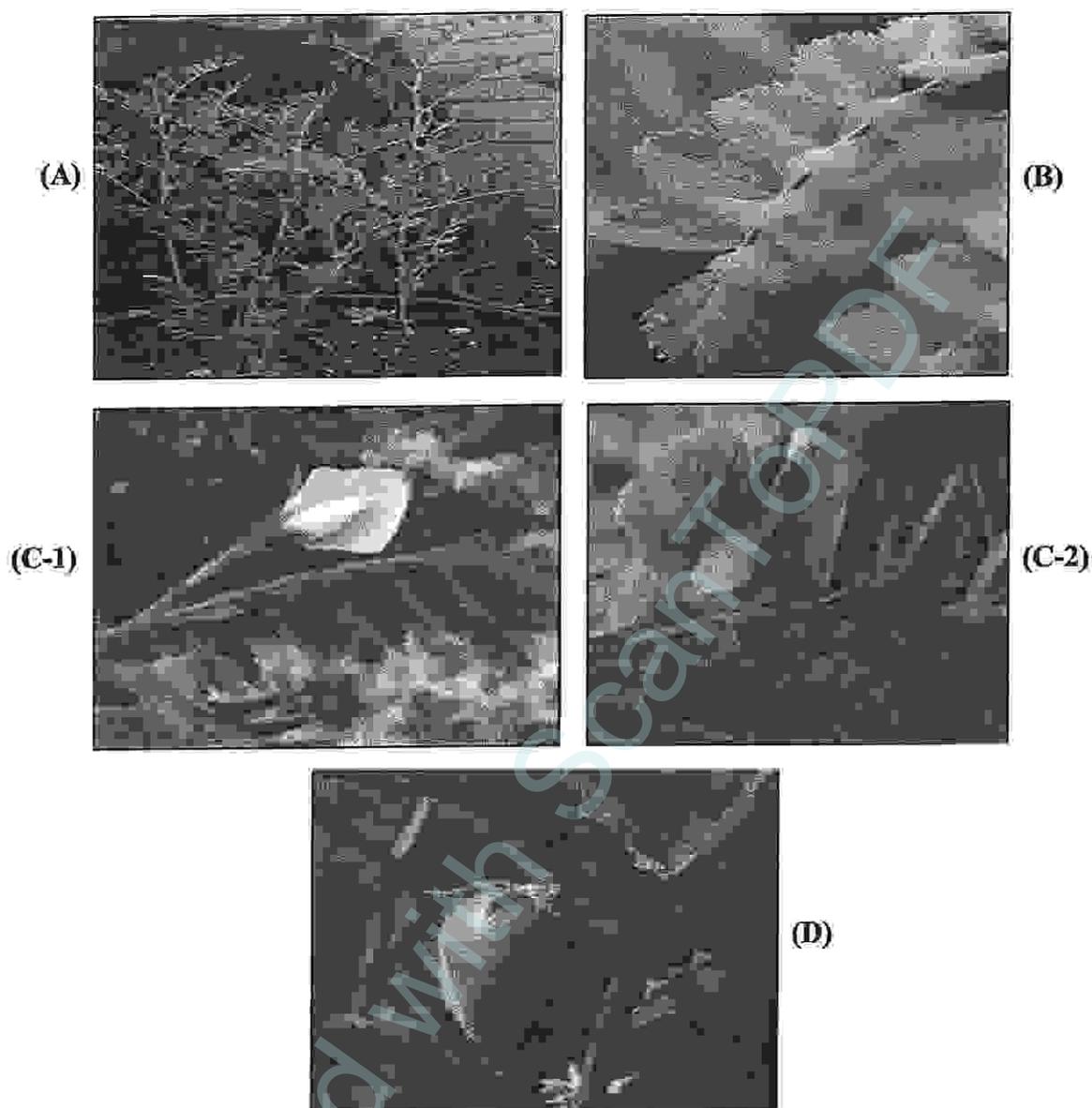


Figure 5 : la plante de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (Site web N° 4).

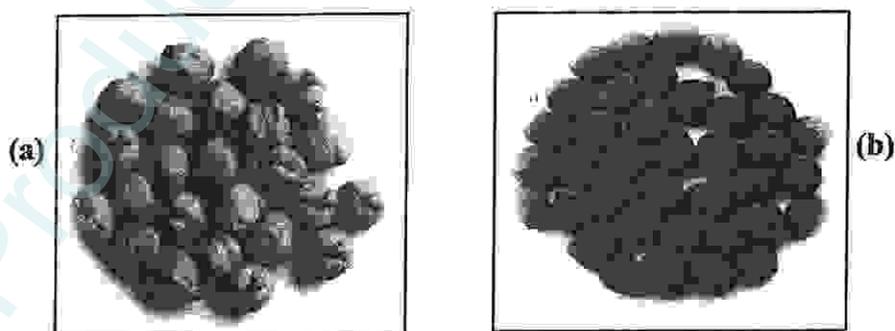


Figure 6 : les graines de pois chiche (*Cicer arietinum* L.).

(a) : Le kabuli ; (b) : Le Desi

(Gordon, 2002).

### 1.2.3. Intérêts nutritionnels :

Le pois chiche constitue une excellente source de protéines (20,5 %), de glucides (61 %), de fibres, de vitamines (groupe B) et de minéraux (phosphore, potassium) avec une valeur énergétique de 362 calories pour 100g (Gordan, 2006).

### 1.2.4. Production de pois chiche en Algérie :

En Algérie, le pois chiche occupe la seconde place après la fève. En dépit, de la grande superficie agricole consacrée pour cette légumineuse, l'Algérie reste dépendante de l'importation. En 2005, 47 milliers de tonnes de pois chiche ont été importés (Gordan, 2006).

## II- 2- Micro-symbiote (les Rhizobiums) :

### II -2-1- Définition :

Les rhizobia forment un groupe de bactéries du sol appartenant aux sous-divisions *Alphaproteobacteria* et *Betaproteobacteria* (Sahgal et Jorhri, 2003). Ces bactéries ont la faculté de fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec plusieurs espèces de fabacées. L'interaction symbiotique se manifeste par l'apparition de nodules racinaires ou caulinaire chez la légumineuse (Jordan, 1984).

### II-2-2- Taxonomie des rhizobiums :

#### 2-2-1- Historique :

Au début, toutes les bactéries symbiotiques des légumineuses ont été classées en un seul genre, nommé *Rhizobium* (Fred *et al.*, 1932).

Jordan en 1984 a classé ces bactéries en deux genres : *Rhizobium* ; qui regroupe les espèces à croissance rapide et le genre *Bradyrhizobium* ; qui inclut les espèces à croissance lente.

En 1988, la taxonomie des rhizobiums s'est considérablement modifiée par la combinaison d'études phénotypiques et génotypiques. Deux nouveaux genres ont été rajoutés : *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) et *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988).

En 1997, le genre *Mesorhizobium* a été additionné par Jarvis *et al.*, suivi du genre *Allorhizobium* en 1998 (Lajudie *et al.*, 1998).

A partir de 2001, de nouveaux symbiotes de légumineuses ont été décrits ; à savoir : le genre *Methylobacterium*, *Burholderia* et *Ralstonia* en 2001, le genre *Blastobacter* et *Devosia* en 2002 et le genre *Ensifer* en 2003.

### 2-2-2-Classification actuelle des rhizobiums :

Actuellement, les rhizobia sont représentés par 12 genres et 44 espèces. Le tableau suivant récapitule les principaux genres et espèces connus ainsi que leurs plantes hôtes.

### II -2-3- Caractéristiques des Rhizobia :

#### 2.3.1. Les critères morphologiques :

Les rhizobia sont des bâtonnets à Gram-négatif, aérobies, hétérotrophes et non-sporulantes. Ils sont souvent arrangés seuls ou en paires et motiles surtout lorsque les cellules sont jeunes. Ils ont une taille variant de 0,5 à 0,9 µm de largeur par 1,2 à 3,0 µm de longueur (Burton, 1979).

#### 2.3.2. Les critères symbiotiques :

L'infectivité des rhizobia exprime le pouvoir de la bactérie à noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées. (Ayisi *et al.*, 1992 ; Kurlovick *et al.*, 1997 ; Howieson *et al.*, 1998).

L'effectivité (ou efficacité) c'est l'aptitude d'un microorganisme à fixer l'azote dans le nodule. Il existe divers degrés dans l'effectivité, une souche de rhizobium sera classée inefficace, efficace ou très efficace selon le niveau de son activité nitrogénasique. (Giraud .E, 2007).

#### 2.3.3. Les critères cultureux :

❖ **Milieu de culture** : la croissance des rhizobia implique une source de carbone, d'azote des facteurs de croissance et des sels minéraux tels que le phosphore et le potassium. Le milieu extrait de levure –mannitol-agar (YEMA : Yeast Extract Mannitol Agar) est le plus utilisé pour la culture des rhizobia (Vincent, 1970).

❖ **Incubation** : elle varie de 3 à 5 jours pour les rhizobia à croissance rapide avec une légère croissance qui peut être détecté au bout de 24 heures. Pour ceux à croissance lente, l'incubation dure de 5 à 10 jours (Date et Holliday, 1987).

Tableau 2 : la classification actuelle des Rhizobiums (El-Hilali.Ibtissam, 2006)

Genres	Espèces	Plantes hôtes
<b><u>Allorhizobium</u></b>		
	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<b><u>Azorhizobium</u></b>		
	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<b><u>Bradyrhizobium</u></b>		
	<i>Br. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Br. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Br. liaoningensis</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Br. Yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
	<i>Br. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>
	<i>Br. canariense</i>	-
<b><u>Mesorhizobium</u></b>		
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis</i>
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
	<i>M. sesquitrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<b><u>Rhizobium</u></b>		
	<i>R. leguminosarum</i>	
	biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, viciae, Lens, Lathyrus</i>
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
	biovar <i>officinalis</i>	
	biovar <i>orientalis</i>	
	<i>R. tropici</i> type IIA et IIB	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium, etc.,</i>
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
	biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	biovar <i>phaseoli</i>	
	biovar <i>gallicum</i>	
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	biovar <i>phaseoli</i>	
	biovar <i>giardinii</i>	
	<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>
	<i>R. yanglingense</i>	"
	<i>R. larrymaorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
	<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>

❖ **Changement de pH du milieu** : ce changement peut être observé par addition de bleu de bromothymol (BTR) dans le milieu. Les rhizobia à croissance rapide se caractérisent par une production acide entraînant un virage de la couleur au jaune. Alors que ceux à croissance lente entraîne un virage au bleu suite à une production alcaline (Date et Holliday, 1987).

#### 2.3.4. Les critères phénotypiques :

▪ **Température** : la température de croissance idéale de la plupart des rhizobia varie entre 25 et 30 °C. En général, ces bactéries sont tolérantes aux basses températures de l'ordre de 4°C et 5°C (Bordeleau et Prévost, 1994).

▪ **pH** : le rhizobium préfère un pH neutre entre 6,8 et 7 (Vincent, 1970). L'intervalle de pH est entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).

▪ **Tolérance à la salinité** : Le stress salin affecte la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol. La plupart des souches sont inhibés par des concentrations de 100 mM NaCl (Singleton *et al.*, 1982). Cependant, il existe des souches très tolérantes ; exemple : Mesorhizobium nodulant le pois chiche peut tolérer 340 mM NaCl.

▪ **Résistance aux antibiotiques** : généralement les rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles que les bradyrhizobia aux antibiotiques suivant : tétracycline, pénicilline G, viomycine, et streptomycine (Jordan, 1984).

▪ **Résistance aux métaux lourds** : Certains métaux tels que le fer, le phosphore, le molybdène, le calcium et le nickel sont indispensables pour la croissance aussi bien des rhizobiums que de leurs plantes hôtes. D'autres métaux tels que l'aluminium, le mercure, etc. ne semblent présenter aucune utilité. La disponibilité de ces éléments se situe soit à des niveaux très bas ou très en excès, au point de la toxicité (Ernst, 1990).

### III. Nodulation :

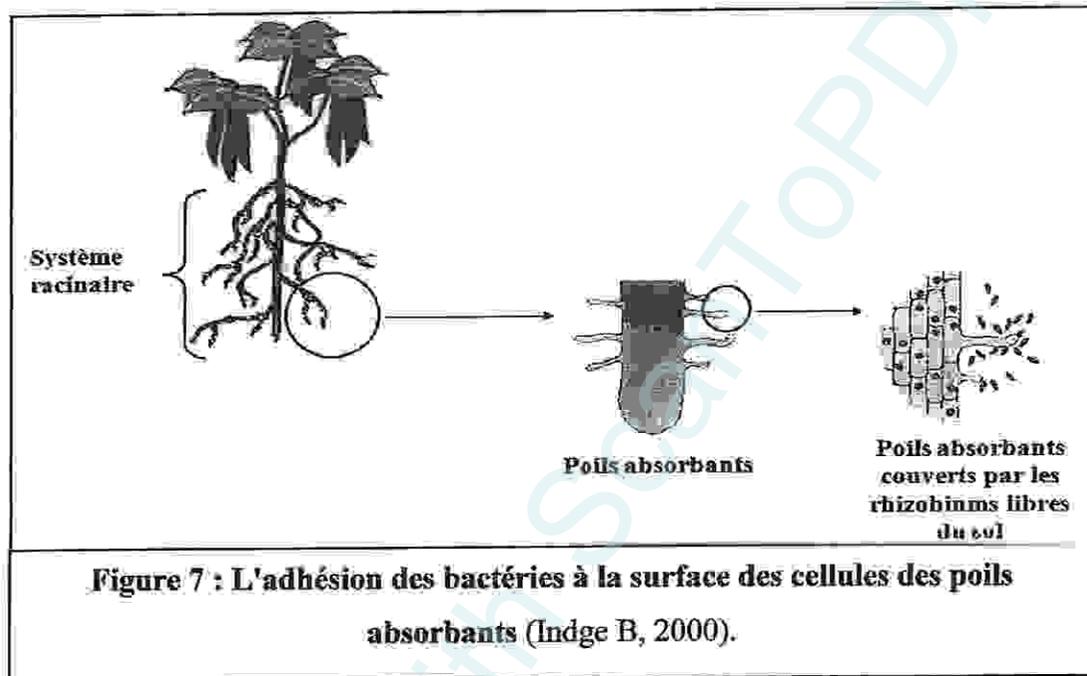
L'interaction symbiotique rhizobia- légumineuse se manifeste par l'apparition de nodules. Ces derniers sont le résultat d'un dialogue moléculaire qui se déroule entre les deux partenaires dans la rhizosphère.

#### III. 1. Processus de formation d'un nodule :

La pénétration des bactéries dans les racines de la plante hôte peut suivre deux procédés : *l'invasion par l'épiderme* via les poils absorbants, ou *l'invasion par le cortex externe* via une pénétration intercellulaire au niveau de fissures de l'épiderme. Cependant, l'infection par l'intermédiaire des poils absorbants est le processus le plus observé chez la plupart des légumineuses. Il se déroule en plusieurs étapes (Van Brussel, *et al.*, 1992).

### III.1.1. Attachement des bactéries :

Les racines de la plante produisent des substances des substances ; nommés flavonoïdes qui ont des effets attracteurs sur les rhizobia du sol .À la suite de leur sécrétion, les bactéries s'accumulent et se fixent sur les poils absorbants (figure7). Cependant, l'attachement des bactéries implique des protéines spécifiques en surface ; appelées les rhicadhésines et les lectines (Godfroy O, 2008).



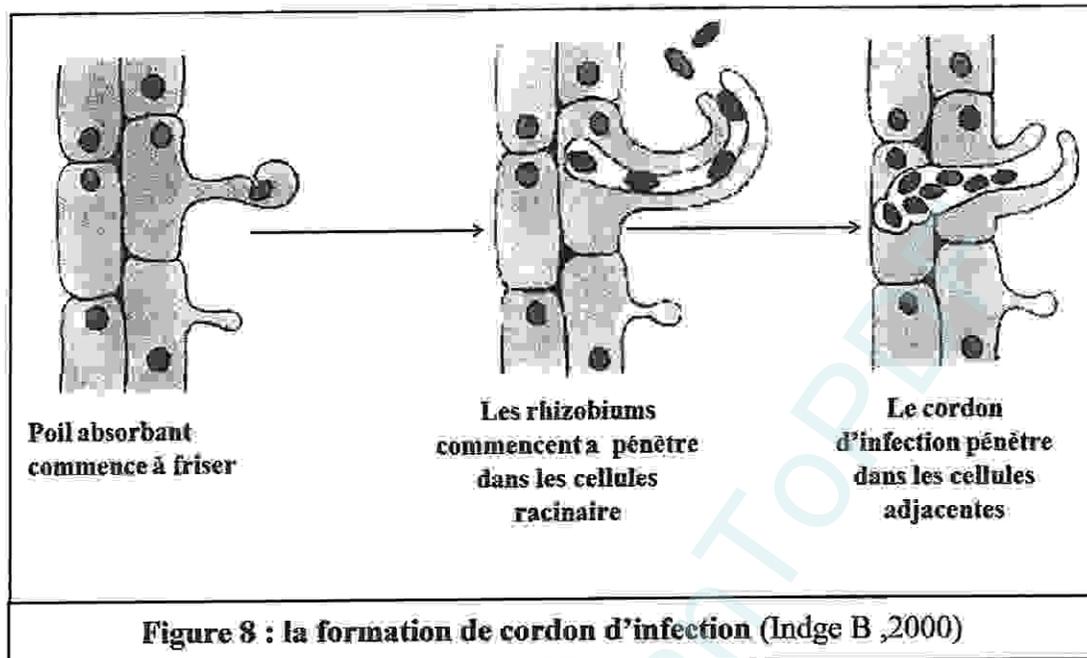
### III.1.2. Déformation du poil absorbant :

Suite à l'accumulation des bactéries à l'apex du poil absorbant. Ces derniers se recourbe et forme une structure en « crosse de berger » qui enferme de façon très serrée les bactéries dans une poche au sein du poil (Figure 8).

A partir de cette poche les bactéries induisent la dégradation partielle de la paroi végétale par hydrolyse et l'invagination de la membrane du poil, ce qui permet la constitution du cordon d'infection (Gough, 2003).

### III. 1.3. Formation du *primordium* nodulaire :

Lors de l'initiation de la formation du filament d'infection, les cellules du cortex interne racinaire entament une série de divisions cellulaires conduisant à leurs multiplications et l'édification d'un méristème nodulaire qui sera à l'origine du futur nodule. Seules les cellules situées sous le site d'entrée des bactéries s'activent et forment un *primordium* (Hirsch, 1992).

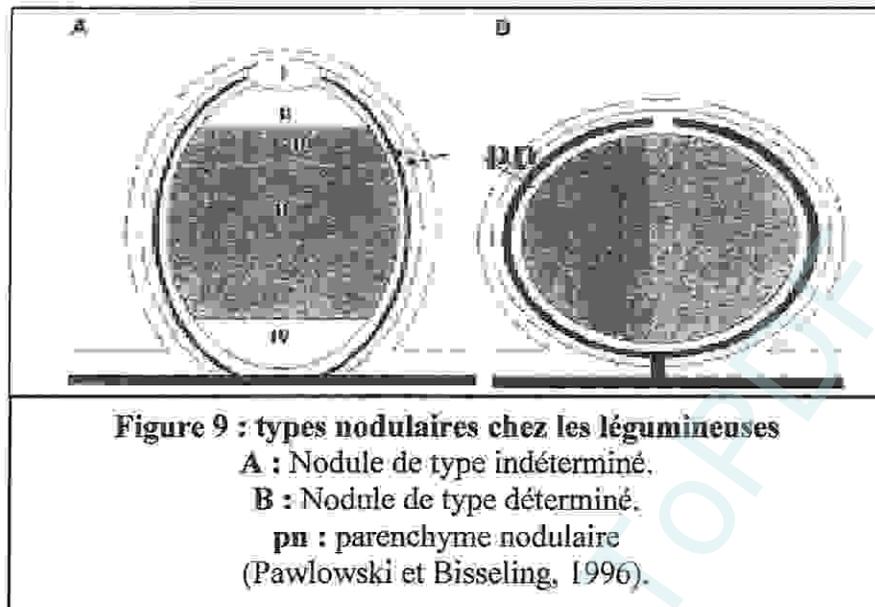


#### III.1.4. Développement du nodule :

L'infection des poils absorbants par les rhizobia induit la différenciation et la division des cellules du cortex. Selon la partie du cortex (interne ou externe) différencié en distingue deux types de nodules (Franssen *et al*, 1992) :

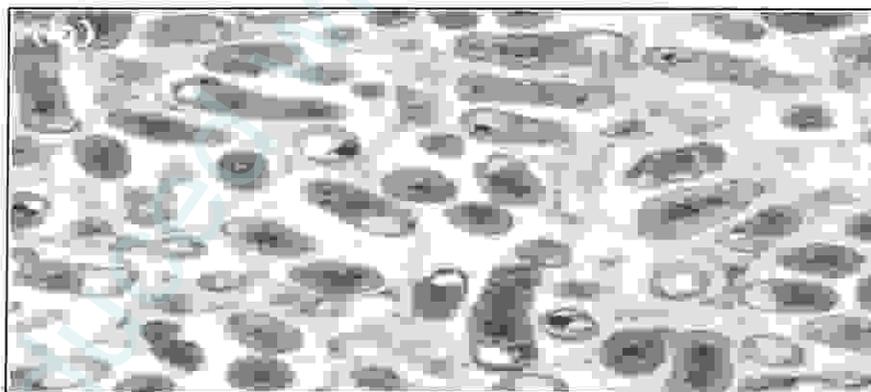
- **Nodosités à croissance indéterminée** : sont formés à partir de cortex interne (Peret. B, 2007) ; où l'activité méristématique se maintient (cas de la vigne, du pois, la vesce et la luzerne) (El.Hillali I, 2006) surtout observés chez les légumineuses tempérées. De nouvelles cellules corticales sont continuellement infectées. Cela résulte en une forme cylindrique (allongée) (figure 9-A) de la nodosité (Godfroy O, 2008).

- **Nodosités à croissance déterminée** : sont formés à partir de cortex externe (Peret. B, 2007) ; où l'activité méristématique cesse tôt (cas du soja, de l'haricot et l'arachide). Ils se caractérisent par une forme sphérique (figure 9-B) (El.Hillali I, 2006).



### III.1.5. Fonctionnement du nodule :

Une fois libérées dans le cytoplasme, les rhizobiums se divisent plusieurs fois pour se différencier en bactéroïdes fixateurs d'azote. Ces derniers présentent différentes formes (figure 10) ; ils peuvent adapter une forme particulière en « Y » ou former des bâtonnets de longueur accrue comme ils peuvent être sphérique (Oke et Long, 1999).



**Figure10 : aspects des bactéroïdes** ; des bactéroïdes différenciés de longueurs accrues, les flèches indique la membrane pér bactéroïdienne entourant un ou plusieurs bactéroïdes (Sprent, 2007).

Un nodule fixateur d'azote se caractérise par une couleur rose due à la présence de la leghémoglobine (figure 11). Il s'agit d'une hémoprotéine dont la synthèse s'effectue dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Ainsi, le groupement prosthétique (hème) est synthétisé par les bactéroïdes alors que la partie protéique (globine) est fabriquée par la plante hôte.

Son rôle est d'assurer l'apport de l'oxygène en faible concentration aux bactéroïdes actif afin de protéger la nitrogénase sensible à l'oxygène (Oke et Long, 1999).

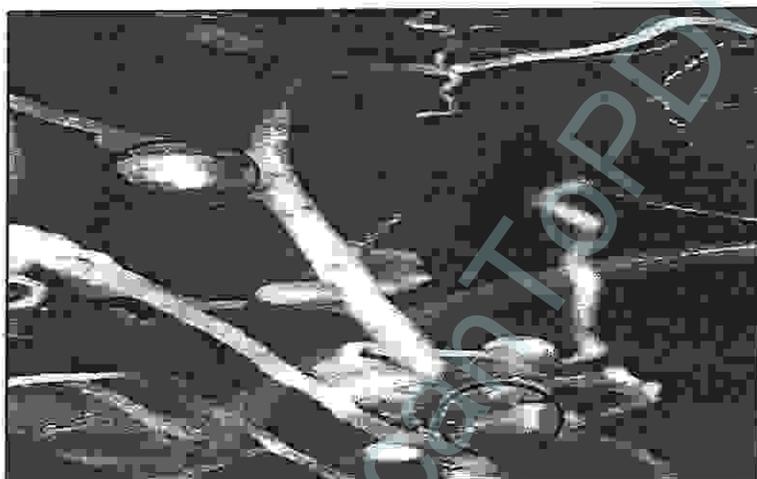


Figure 11 : Nodule fixateur d'azote de couleur rose (Oke et Long, 1999).

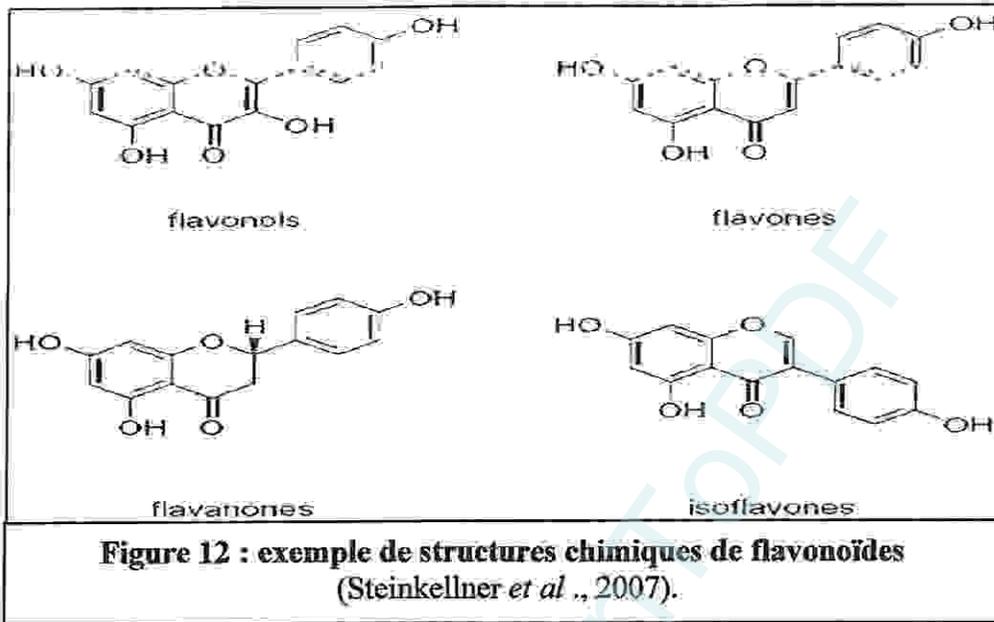
## VI. Interaction moléculaires rhizobium/légumineuses :

### **VI.1. Excrétion des flavonoïdes :**

Les plantes rejettent, par l'intermédiaire de leurs racines, une grande quantité de composés carbonés dans le sol (Perret P, *et al.*, 2000). Ce mélange de molécules organiques constitue les exsudats racinaires qui se composent d'acides organiques, d'acides aminés, de vitamines, de sucres et de dérivés phénoliques. (Duhoux et Nicole, 2004 ; Laplaze, *et al.*, 1999 ; Wall, 2000).

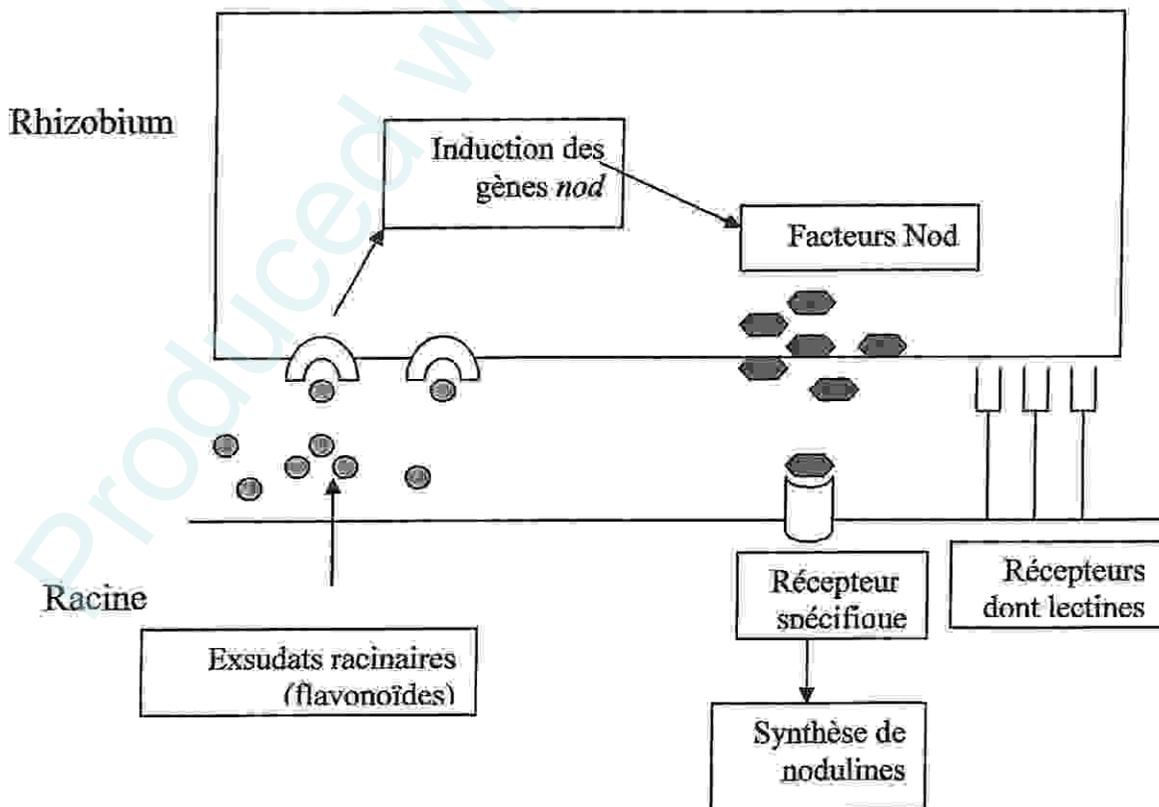
C'est parmi ces derniers que l'on trouve les flavonoïdes appartenant à quatre groupes chimiques (figure 12) : flavones, flavanones, flavonols et isoflavones (Schlaman *et al.*, 1998).

D'une part, les flavonoïdes ont un effet de chimio-attraction des bactéries et d'autre part il active l'expression des gènes *nod* bactériens (gène impliqués dans la nodulation). Ces derniers codent pour la synthèse des facteurs Nod (Fisher, *et al.*, 1988 ; Rostas, *et al.*, 1986).



**VI.2. Production des facteurs Nod :**

En présence des flavonoïdes, les protéines régulatrices NodD de la bactérie cible sont activées et induisent la production de signaux bactériens extracellulaire nommés facteurs de nodulation ou facteurs Nod (figure 13). Ces derniers sont impliqués dans le processus d'infection et l'organogénèse des nodules (Boivin *et al.*, 1998).



**Figure 13 : Schéma représentant le dialogue moléculaire, échanges de signaux chimiques entre rhizobium et racine de légumineuse (Pelmont, 1992).**



***Chapitre II :***  
***Matériels***  
***et***  
***méthodes***

Produced with Scantopdf

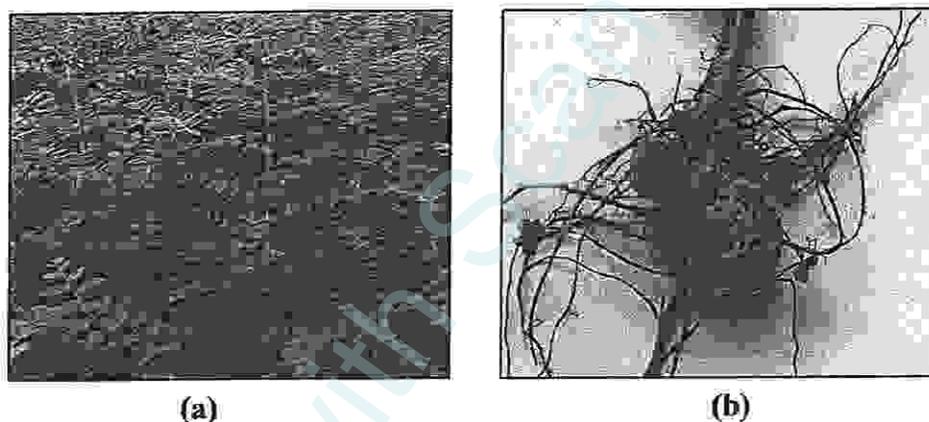
## I-Matériels :

### I-Matériel végétal :

#### ❖ Les nodules de pois chiche (*Cicer arietinum* L.):

Les nodules de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) utilisés dans cette étude, appartenaient au cultivar hivernal FLIP 90-13. La collecte des plants a été réalisée à partir du terrain d'expérimentation de l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de la ville de Guelma.

Les nodules utilisés pour l'isolement des rhizobia ont été prélevés de la partie racinaire des plants de *Cicer arietinum* L. (Figure14).



**Figure 14 : les nodules de pois chiche;**

**(a) : aspect des plants collectés, (b) : aspect des nodules collectés.**

#### ❖ Les graines de pois chiche:

Les graines de *Cicer arietinum* L. ; cultivar FLIP 90-13 (récolte 2009), fournies par l'Institut ITGC, ont été utilisées afin de tester l'infectivité des isolats (Figure 15).



**Figure 15 : graine de *Cicer arietinum* L. ; cultivar FLIP 90-13.**

## 2-Les milieux de culture :

### ❖ Milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) additionné de rouge Congo:

Les milieux de culture YEMA à base d'extrait de levure (Yeast Extract) et mannitol (comme source de carbone) sont les plus utilisés pour l'isolement des rhizobia. La composition du milieu YEMA utilisé dans notre travail est représentée en annexe.

L'additionnement du colorant rouge de Congo au milieu YEMA permet de différencier les rhizobia des autres groupes de bactéries et faciliter ainsi l'isolement (voir annexe).

### ❖ Milieu YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth):

Le bouillon YEM a été utilisé pour réaliser les tests phénotypiques ainsi que la conservation des souches nodulantes sur glycérol.

### ❖ Milieu YEMA additionné de bleu de bromothymol :

Ce milieu a été utilisé pour étudier l'effet du métabolisme des isolats sur la variation du pH du milieu de culture.

La composition des différents milieux utilisés est représentée en annexe.

## 3-Les solutions d'arrosage :

La solution nutritive utilisée pour l'arrosage des plants de pois chiche est à base d'extrait du sol. Ce dernier a été pris du terrain d'expérimentation ITGC. Ainsi, la méthode de préparation de cette solution nutritive est représentée en annexe.

## **II-Méthodes :**

### 1-Collecte des nodules :

Les nodules sont isolés à partir des racines des plants de pois chiche précédemment collectés de l'ITGC.

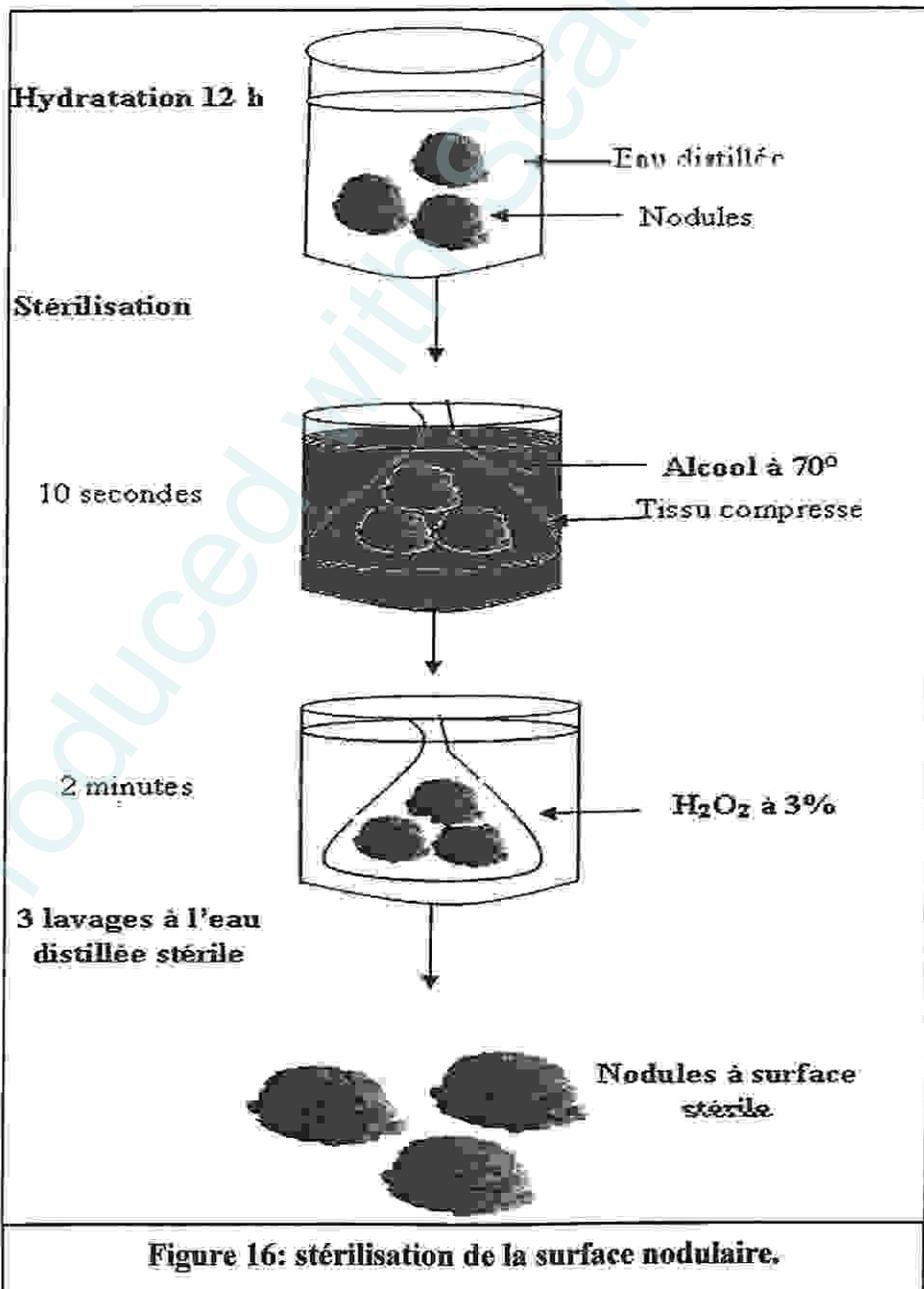
Les parties racinaires sont lavées abondamment à l'eau de robinet. Par la suite les nodules sont collectés en coupant à 0,5 cm de chaque côté du site d'attachement.

Après, pour une utilisation immédiate les nodules sont hydratés une nuit dans l'eau distillée à une température de 4°C (Date et Halliday, 1987).

## **2- Préparation de la suspension bactérienne :**

### **2-1- Stérilisation de la surface nodulaire :**

Après lavage abondant à l'eau distillée, les nodules sont mis dans un tissu compressé stérile. Par la suite, la stérilisation de leurs surface est réalisée par une succession d'immersion dans l'alcool à 70° pendant 10 secondes, puis dans le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% pendant 2 minutes, suivi par un rinçage à l'eau distillée stérile au moins trois fois (Date et Halliday, 1987). Le protocole de la stérilisation des nodules est présenté dans la Figure 16.



### 2-2- Écrasement des nodules :

Dix nodules ont été écrasés selon le protocole suivant :

- Mettre chaque nodule dans un tube à hémolyse stérile à l'aide d'une pince flambée ;
- Ensuite, additionner 1 ml d'eau distillée stérile dans chaque tube;
- En fin, faire l'écrasement au moyen d'une spatule stérile jusqu'à l'obtention d'un broyat nodulaire.

### 3- Isolement des souches de rhizobia :

A partir de chaque broyat nodulaire, on a réalisé un étalement sur une boîte de pétri contenant le milieu YEMA avec rouge Congo à pH 6,8 (voir annexe). Après 24 h d'incubation à 28°C, les colonies n'ayant pas absorbé le colorant (colonies blanchâtres ou légèrement rosées) sont isolées (Vincent, 1970) et repiquées pour vérifier leur pureté (Figure 17).

#### 3-1- Coloration a la fuchsine :

Au cours de l'isolement et la purification la forme des isolats a été vérifiée par coloration à la fuchsine. Cette étape, permet de sélectionner les formes typiques des isolats; a savoir, courts ou très courts bâtonnets.

##### *Les étapes :*

- Fixer le frottis par passage de la lame propre dans la flamme du bec.
- Couvrir la lame par la fuchsine et laisser agir pendant une minute.
- Rincer et sécher la lame puis observer au microscope à l'objectif à immersion.

#### 3-2- Conservation des isolats :

Après leurs purifications, les isolats présumés être des rhizobia ont été conservés à 4°C dans des tubes inclinés de milieu YEMA pour pouvoir réaliser des tests phénotypiques ultérieurement.

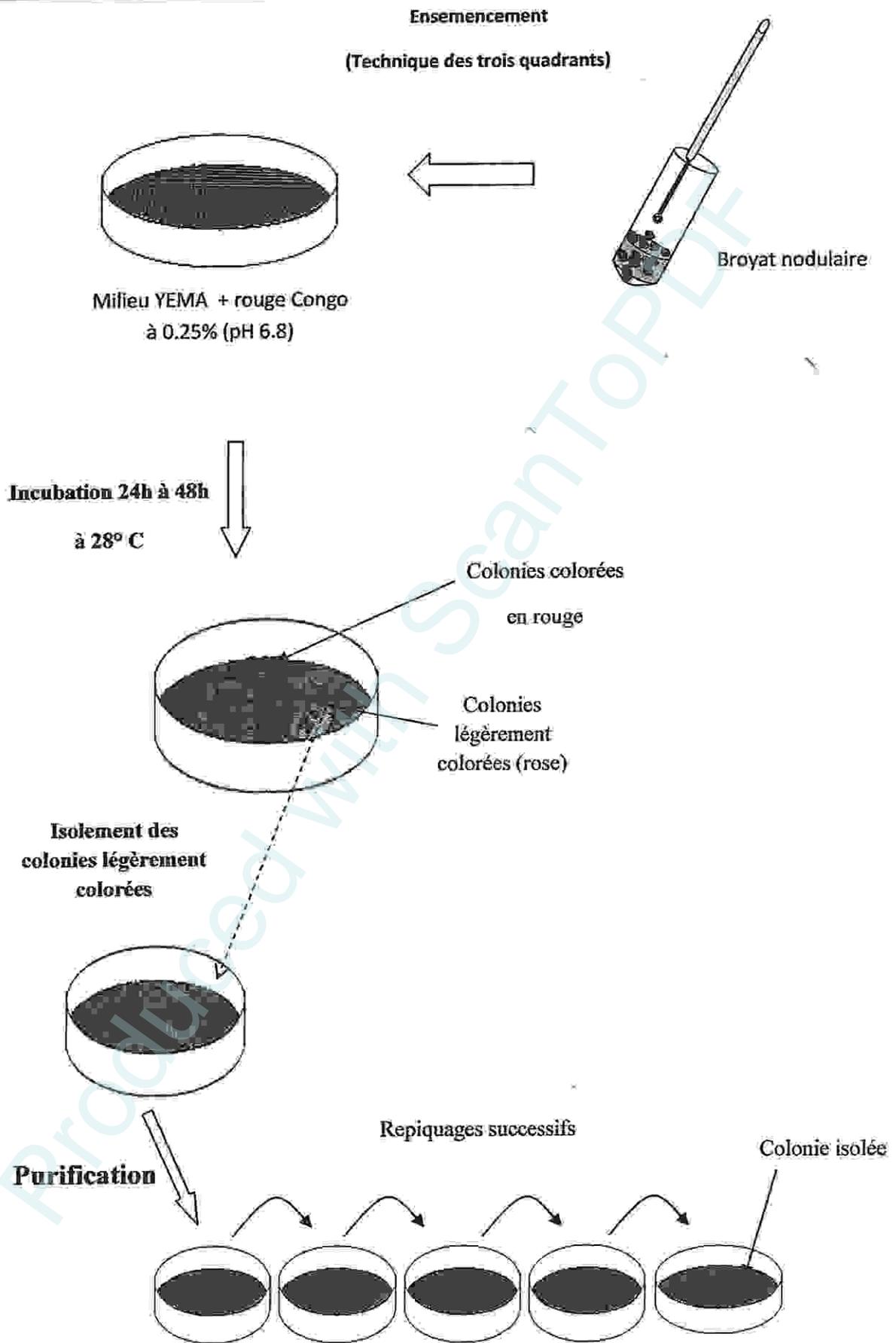


Figure 17 : technique d'isolement des rhizobia.

**4-Études des caractères phénotypiques des isolats :****4-1- Les caractères culturaux :**

Les isolats du pois chiche ont été caractérisés par :

- l'aspect de leurs colonies sur milieu YEMA additionné de rouge Congo (voir annexe).
- La variation du pH en culture, testée sur le milieu YEMA additionné de bleu de bromothymol (voir annexe).

**4-2- Les caractères microscopiques :**

Les isolats des nodules racinaires du pois chiche ont subi une coloration de Gram pour confirmer leur appartenance au Gram négatif et pour examiner également leurs aspects microscopiques à savoir forme et taille des bactéries.

Après fixation des bactéries sur une lame propre par la flamme du bec, les étapes de la coloration est présentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3 : les étapes de coloration de Gram**

Les étapes	Produit	Temps de réaction
Coloration	Violet de Gentiane	1 minute
Fixation	Lugol	30 secondes
Rinçage avec l'eau distillée		
Décoloration	Rinçage avec L'éthanol	30 secondes
Rinçage avec l'eau distillée		
Recoloration	Fuschine	1 minute
Rinçage avec l'eau distillée, séchage à la flamme de bec Bunsen suivie d'une observation microscopique à immersion.		

#### 4-3- Les critères physiologiques :

##### ➤ Tolérance a La température :

Le test a été réalisé sur le milieu YEMA à pH 6,8 ; en incubant les isolats a des températures allant de 5°C jusqu'à 50°C. La lecture a été faite après 24 à 48h d'incubation.

##### ➤ Tolérance au pH :

La tolérance au pH a été révélée sur le milieu solide YEMA. Le pH du milieu a été ajusté à des valeurs de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,12 et13.

Pour les pH 1; 2 ; 3 et 14, les tests ont été reconduits sur le milieu YEM liquide, dans ce cas la lecture des résultats a été fait par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm, après 24 h d'incubation à 28 °C.

##### ➤ Tolérance a la salinité :

L'étude de la tolérance des isolats à la salinité a été réalisée sur le milieu solide YEMA à pH 6,8. Les souches ont été incubées a différentes concentrations en NaCl : 0% ; 1% ; 2% ; 4% ; 6% ; 8% ; 9% ; 10%.

##### ➤ Tolérance aux métaux lourds :

Le test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à cinq différents types de métaux lourds Pb 250 µg/ml ; Al 250 µg/ml ; ZnCl<sub>2</sub> 50µg/ml; Cu 50 µg/ml ; Co 25µg/ml.

Les différents métaux utilisés sont ajoutés séparément au milieu YEMA solide à pH 6,8 (avant l'autoclavage de milieu).

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 à 48h.

##### ➤ Résistance aux antibiotiques:

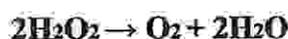
Ce critère a été testé sur milieu Muller Hinton (MH), en utilisant des disques imprégnés d'antibiotiques (méthode de diffusion).Cinq antibiotiques ; Amoxiciline [AMX = 25 µg/ml] ; Erythromycine [E=15µg /ml] ; Sulfamide [SSS= 200µg/ml] ; Péniciline [P=6 µg/ml] et Pristinamycine [PT=15µg/ml] ont été testé.

Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24 à 48h.

#### 4-4- Les critères biochimiques :

##### ➤ Recherche de la catalase :

Ce test permet de montrer la présence ou l'absence de catalase. Cette enzyme permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) résultant de l'oxydation des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe, selon la réaction suivante :



##### • La méthode

Déposer dans une boîte de pétri propre, une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), puis la mettre en contact avec une goutte de suspension bactérienne.

##### • Lecture

Une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat de bulles gazeuses (Dellaras, 1998).

##### ➤ Recherche de l'oxydase :

La recherche de la *phénylène diamine oxydase* est un des critères les plus employés pour l'identification des bactéries surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le *N diméthyl paraphénylène diamine*. Ce dernier, est mauve clair et en présence de l'enzyme, il libère un composé mauve foncé.

##### • La méthode

Déposer sur une lame propre les disques d'oxydase (pré-imbibés par le réactif), imbibés avec une goutte d'eau distillée ou eau physiologique stérile.

Prélever une colonie de la souche à tester à l'aide d'une pipette pasteur stérile et l'étaler sur le disque.

##### • Lecture

Une réaction positive se manifeste par changement de couleur de disque vers le mauve foncé (Dellaras, 1998).

#### 5- Étude de l'infectivité :

L'infectivité des isolats pour leurs plante hôte *Cicer arietinum* L. ; a été vérifiée par le test de nodulation.

➤ **Principe :**

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia. Le test de nodulation ou le test d'infectivité est basé sur l'inoculation dans des conditions contrôlés, des graines de pois chiche par les souches isolées.

Après quatre à six semaines d'inoculation, l'infectivité des souches est observée par la formation de nodules racinaires sur les plants inoculés. Ceci signifie que les isolats ont été infectifs vis-à-vis de leur plante hôte *Cicer arietinum* L.

➤ **Protocol expérimental :**

❖ **Germination des graines**

Les graines de pois chiche, cultivar FLIP 90-13 sont désinfecté avec l'alcool 70° ; suivie d'un rinçage avec l'eau distillé stérile. Après, les graines sont mises à germer dans des boite de pétri recouvert préalablement d'une couche de coton stérile imbibé d'eau distillée stérile ; en s'assurant que le coton où les graines de pois chiche soit toujours humide.

L'incubation est effectuée à température ambiante pendant 4 à 5 jours jusqu'à l'apparition des radicelles (Figure18).

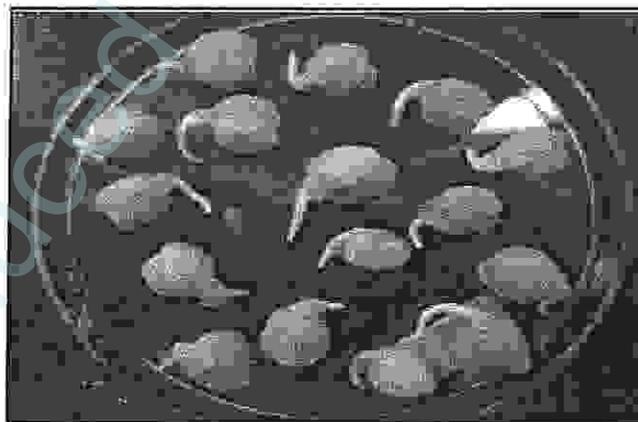


Figure 18 : germination des graines de pois.

❖ **Stérilisation du sol :**

Le sol utilisé pour la réalisation de ce test a été pris du terrain de l'ITGC. Sa stérilisation est réalisée au four pasteur pendant 1 h à 200°C.

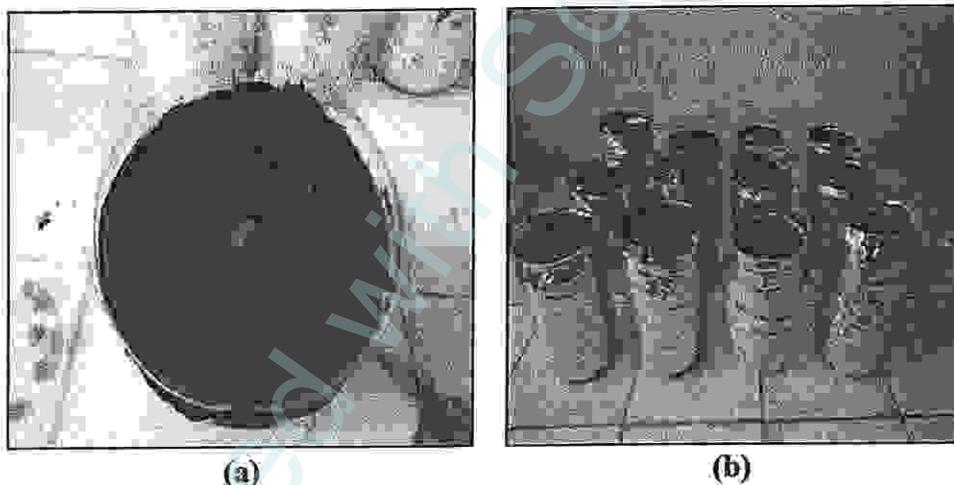
❖ *Préparation des pots :*

Les pots utilisés sont en plastique désinfecté par l'eau de javel suivi d'un rinçage à l'eau distillée ; ensuite ces pots ont été troués à la base, et recouverts de papier aluminium.

Après stérilisation du sol, les pots sont remplis d'une couche de gravier qui a été déposée au fond et du sol stérile. Le gravier a été placé au fond des pots à fin de préserver l'humidification du mélange (Date et Halliday, 1987).

❖ *Semis des graines germées :*

Le semis des graines a été réalisé 48h avant l'inoculation en mettant une graine germée par pot. Ces graines ont été déposées dans un trou de 3 cm de profondeur en orientant la radicelle vers le fond du trou (Figure 19).



**Figure 19 : semis des graines.**

(a) : une graine semis par pot, (b) : lot des pots semis.

❖ *Préparation des inoculum :*

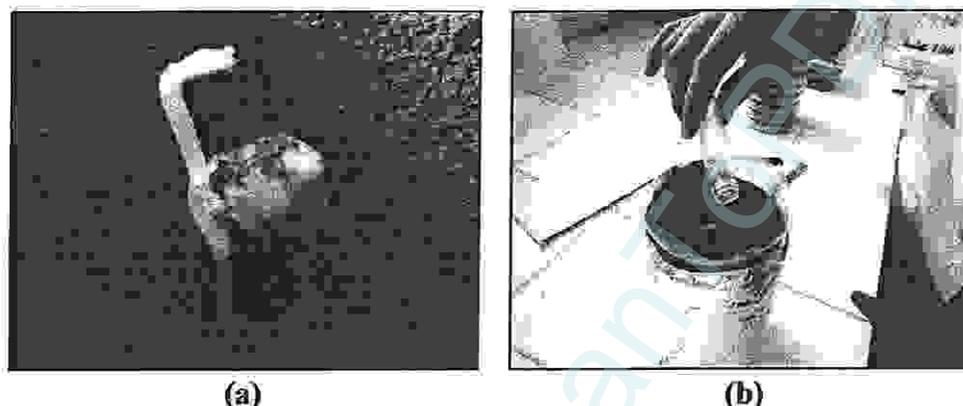
Chaque isolat est cultivé sur deux tubes inclinés de milieu YEMA pendant 48h à 28°C. Après incubation, 1 ml d'eau physiologique à 0.9% est additionné à chaque tube qui sera agité jusqu'à avoir un maximum de culture dans le 1ml de la solution physiologique.

❖ *Inoculation des graines :*

Après 48h du semis, les 2 ml de chaque inoculum ont été versés sur les radicules préalablement exposé à l'aide d'une spatule (Figure 20).

Cependant un plant témoin nommé  $T_0$  est non inoculé afin de vérifier que le test s'est déroulé dans des conditions stériles.

Après inoculation, les pots ont été placés dans un espace bien aéré et exposé au rayon de soleil (Figure 21).



**Figure 20 : inoculation des graines.**

(a) : exposition de la radicule, (b) inoculation.



**Figure 21 : exposition de la culture à la lumière du jour.**

#### ❖ **Arrosage :**

L'arrosage journalier (deux fois par jour) a été fait avec solution nutritive extraite du sol préalablement prélevées de site d'échantillonnage.

#### Le *F. pasteurianus* des racines nodulantes :

- Pour chaque souche, une suspension bactérienne a été préparé dans 1.8 ml de milieu liquide YMR (voir annexe).



***Chapitre III:***  
***Résultats***  
***et***  
***discussion***

Produced with ScanTOPDF

### **1- Isolement des rhizobia:**

Durant notre travail, dix souches présumées être des rhizobia ont été isolées sur milieu YEMA additionné de rouge de Congo à 0,25%.

### **2- Étude des caractères culturels des isolats :**

#### **2-1- Sur milieu YEMA additionné de rouge de Congo :**

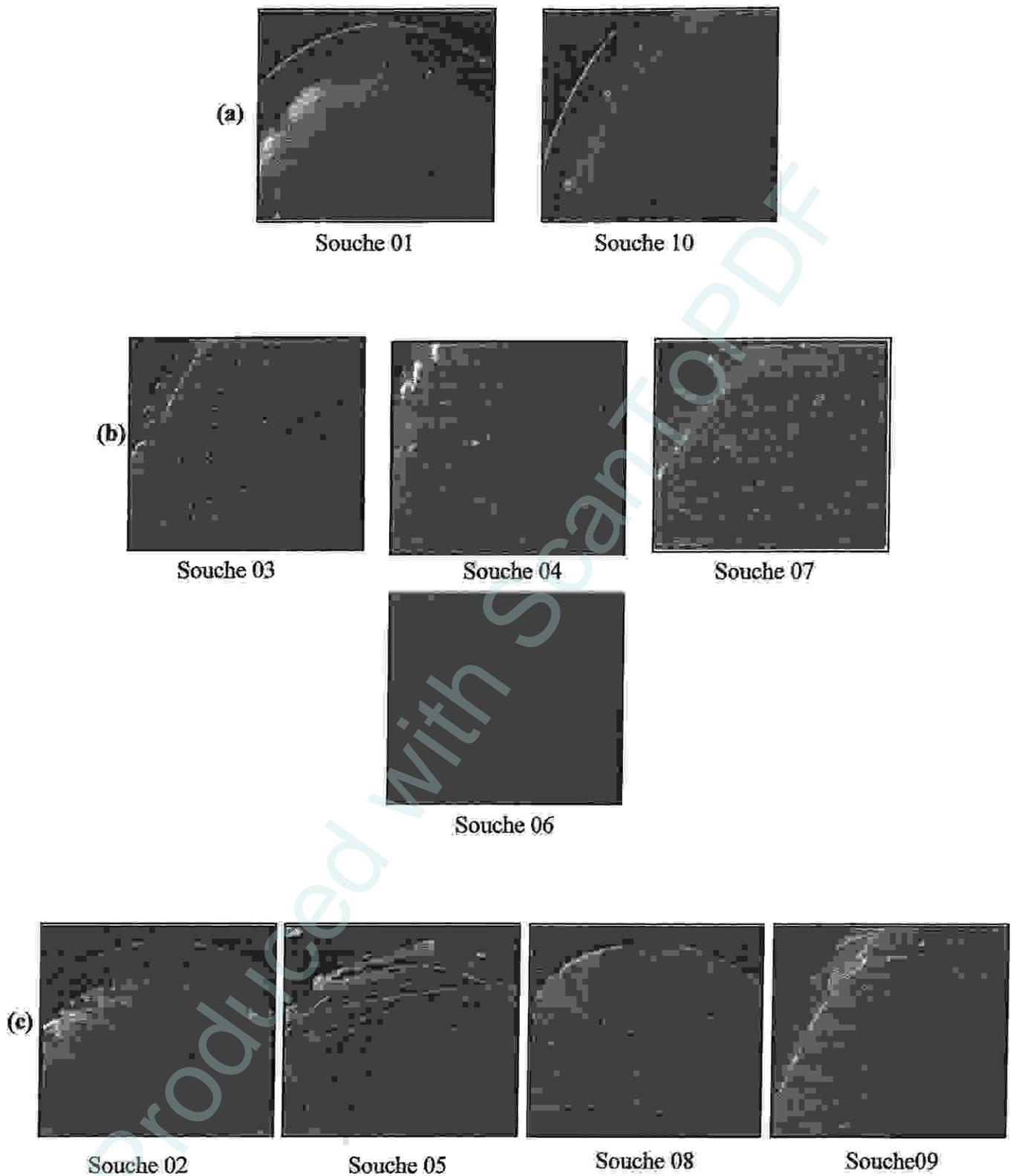
Après 24 à 48 heures d'incubation, l'observation macroscopique des isolats sur ce milieu a montré des colonies circulaires, bombées, brillantes, mucilagineuses, translucides ou opaques ainsi que des colonies laiteuses. L'absorbance du colorant (rouge Congo) a été faible voir nulle, manifestée par la couleur rose claire ou blanche des colonies. La figure ci-dessous représente l'aspect culturel des souches isolées. A noter que la numérotation des souches a été faite selon l'ordre d'isolement.

Nous remarquons que les isolats des nodules racinaires de pois viche sont à croissance rapide ayant une variabilité dans l'aspect macroscopique dont les caractéristiques correspondent à ceux décrits par Jordan (1984).

#### **2-2- Sur milieu YEMA additionné de bleu de bromothymol :**

L'étude du changement de pH en culture a montré que 8/10 des souches acidifiaient le milieu YEMA + BTB. Les souches : 01, 04, 05, 06, 07, 08, 10 ont induit une réaction très acidifiante marquée par le virage de la couleur verte du milieu au jaune (Figure 23, c). Par contre la souche 09 a provoqué une légère acidification manifestée par un léger virage au jaune (Figure 23, b).

Cependant, les souches 02 et 03 ont induit une alcalinisation observée par le virage de la couleur du milieu au bleu (Figure 23, d).

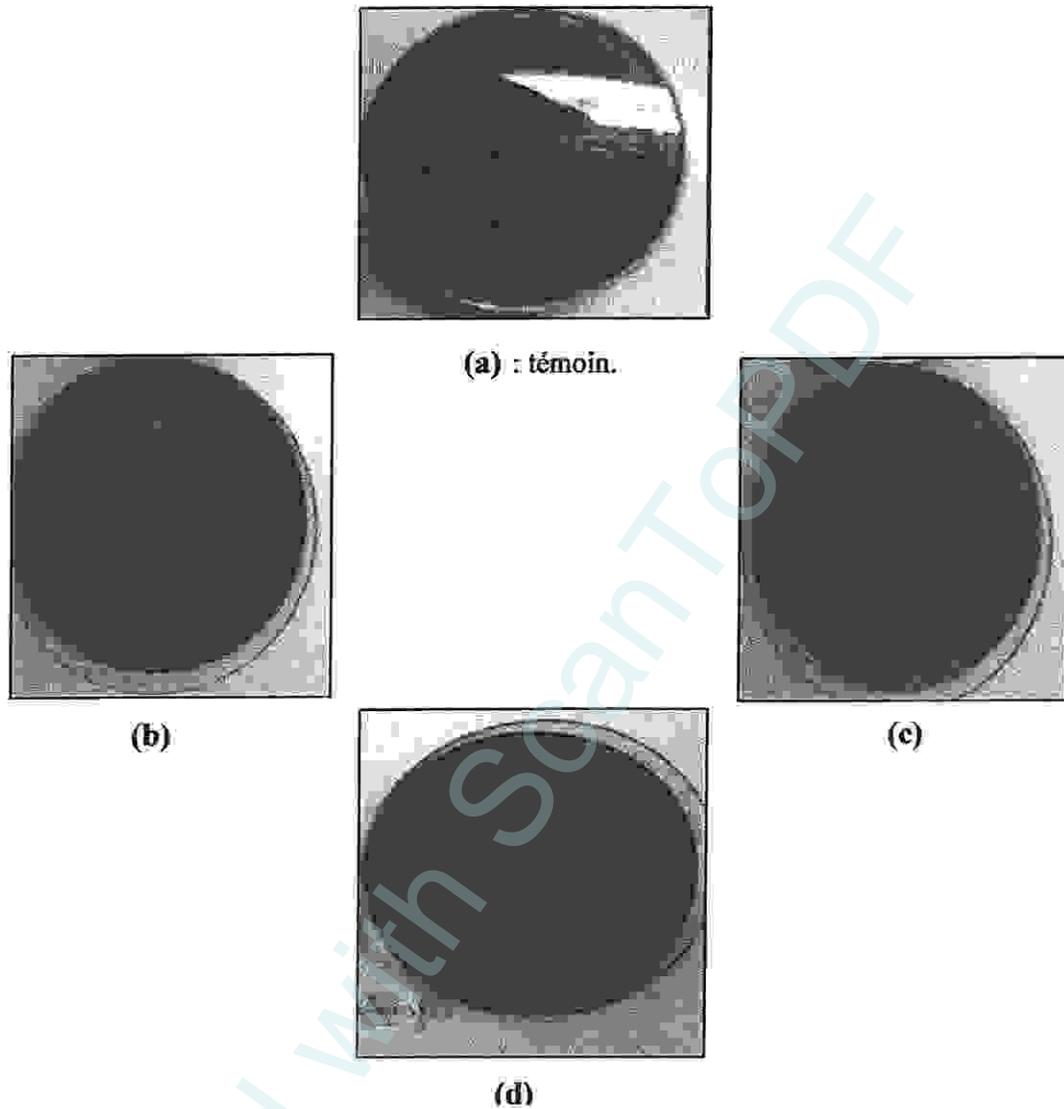


**Figure 22 : aspect cultural des souches isolées ;**

(a) : Étalement brillant, bombé, mucilagineuse, translucide ;

(b) : Étalement, colonies laiteuse, blanchâtre ;

(c) : Colonie circulaire (isolé), opaque, bombé.



**Figure 23: acidification et alcalinisation des souches nodulant le *Cicer arietinum* L. ;**

**(a) : témoin ;**

**(b) : souche 09 - réaction légèrement acidifiante ;**

**(c) : souche 10 - Réaction très acidifiante ;**

**(d) : souche 03 - Réaction alcaline.**

### 3- Étude des caractères microscopique :

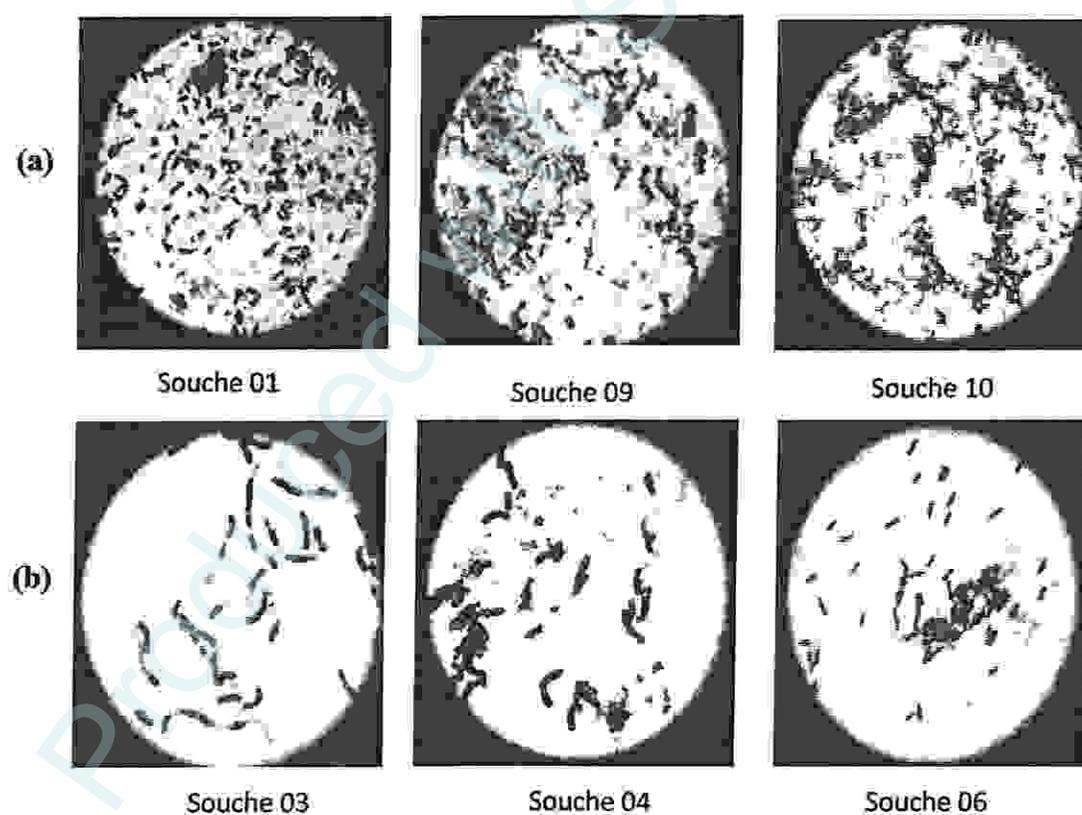
La coloration de Gram des isolats a montré des bâtonnets à **Gram négatif** (couleur rose). Ce résultat correspond à l'un des critères des rhizobia décrits dans le *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (1984). Ainsi, la taille de ces bâtonnets a varié entre une largeur de  $[0,1-0,2]$   $\mu\text{m}$  et une longueur de  $[0,2-1]$   $\mu\text{m}$ . Le tableau ci-dessous représente les dimensions des souches étudiées.

Tableau 4 : longueur et largeur des bâtonnets isolés

N° de Souche Taille ( $\mu\text{m}$ )	Souche									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Longueur	0,3	0,8	1	0,9	1	1	0,4	0,2	0,4	0,2
Largeur	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2

À partir de ce tableau, on peut déduire que les souches 02, 03, 04, 05 et 06 sont des courts bâtonnets; alors que les souches 01, 07, 08, 09, 10 sont des très courts bâtonnets.

La figure 24 représente les photos de quelques souches isolées et illustrant les deux formes de bâtonnets observées.



**Figure 24 : aspects microscopiques des isolats;**

**(a): très courts bâtonnets, (b) : courts bâtonnets.**

#### 4- Étude des critères physiologiques :

##### ➤ Tolérance au pH :

Les résultats obtenus sur l'étude de la tolérance aux pH acides et alcalins de l'ensemble des souches sont présentés dans la figure 25.

Comme le montre cette figure, la totalité des souches testées ont pu pousser et tolérées des valeurs de pH acide allant de 4 jusqu'à 10. Ce l'indique que ces souches sont acido-baso-tolérantes. Nos résultats sont en accord avec Graham (1964) et Jordan (1984), où les rhizobia peuvent tolérer des pH allant de 4,5 jusqu'à 9

Cependant, aux pH très acides, 2/10 des souches ont pu tolérées un pH 3 observé chez les souches 02 et 03. Notons également que la souche 02a montré une tolérance aux pH1 et pH 2. En revanche aux pH très basique (au-delà de pH10) aucune tolérance n'a été détectée.

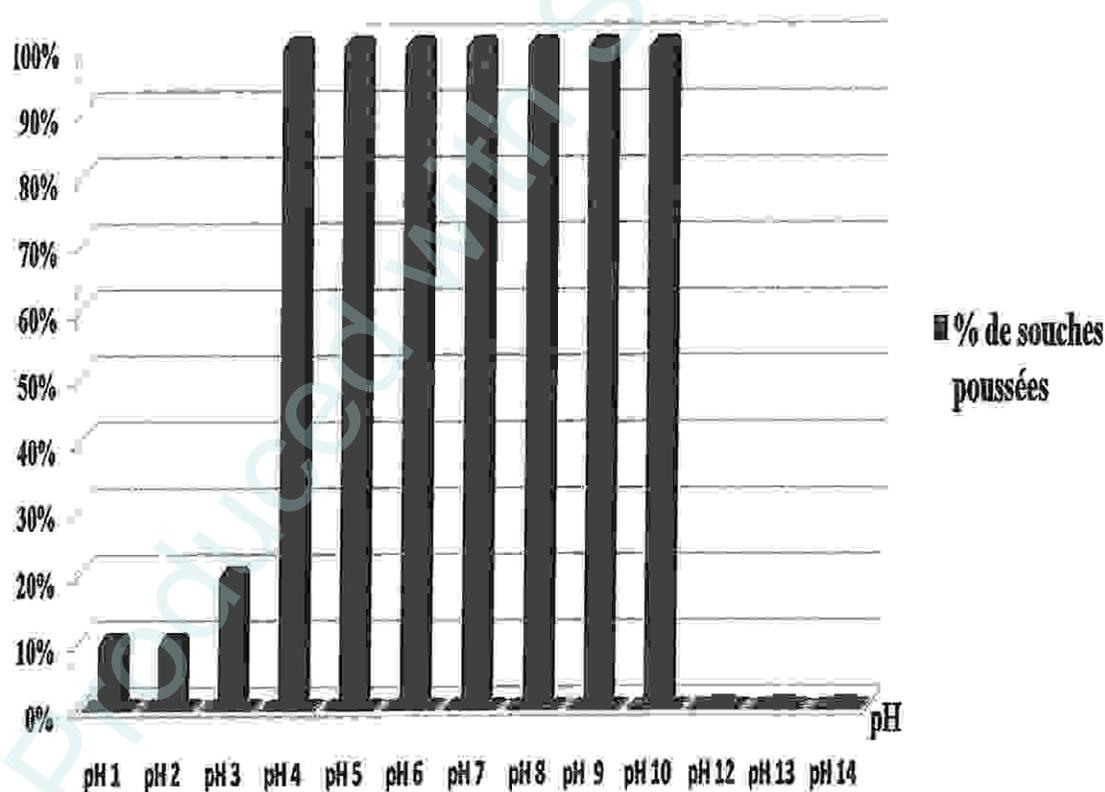


Figure 25 : effet du pH sur la croissance des isolats de *Cicer arietinum* L.

➤ Tolérance de la température :

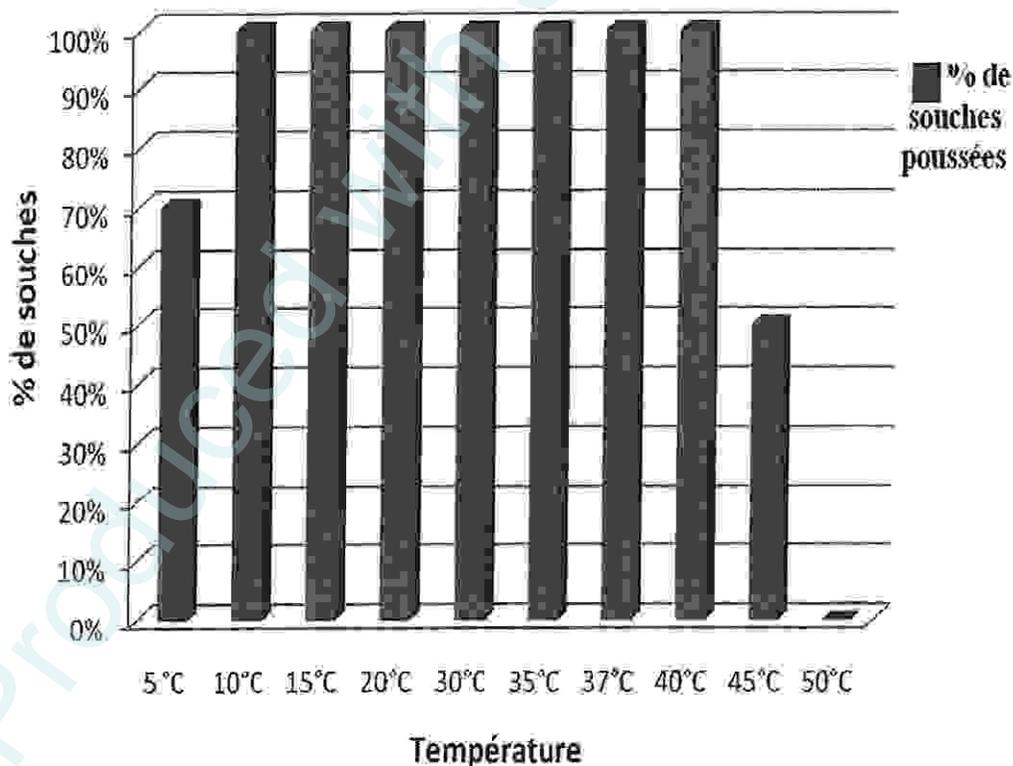
Les résultats indiquant les marges de tolérance à la température des souches isolées de *Cicer arietinum* L. sont représentées dans la figure ci-dessous.

D'après ces résultats, nous remarquons que la totalité des souches testées tolèrent des températures variant de 10 à 40°C.

Cependant à 5°C, les souches 2, 5 et 9 n'ont présenté aucun développement. Ainsi, 50% des souches testées n'ont montré aucune croissance à une température de 45°C à 50°C toutes les souches sont non tolérantes.

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

De plus, plusieurs études ont rapporté que les rhizobia ont l'aptitude de tolérer une température de 40°C (Moawad et Beck, 1991 ; de Lajudie *et al.*, 1994 ; Zahran *et al.*, 1994 ; Missbah et Idrissi, 1996).



**Figure 26 : effet de température sur la croissance des souches nodulant le *Cicer arietinum* L.**

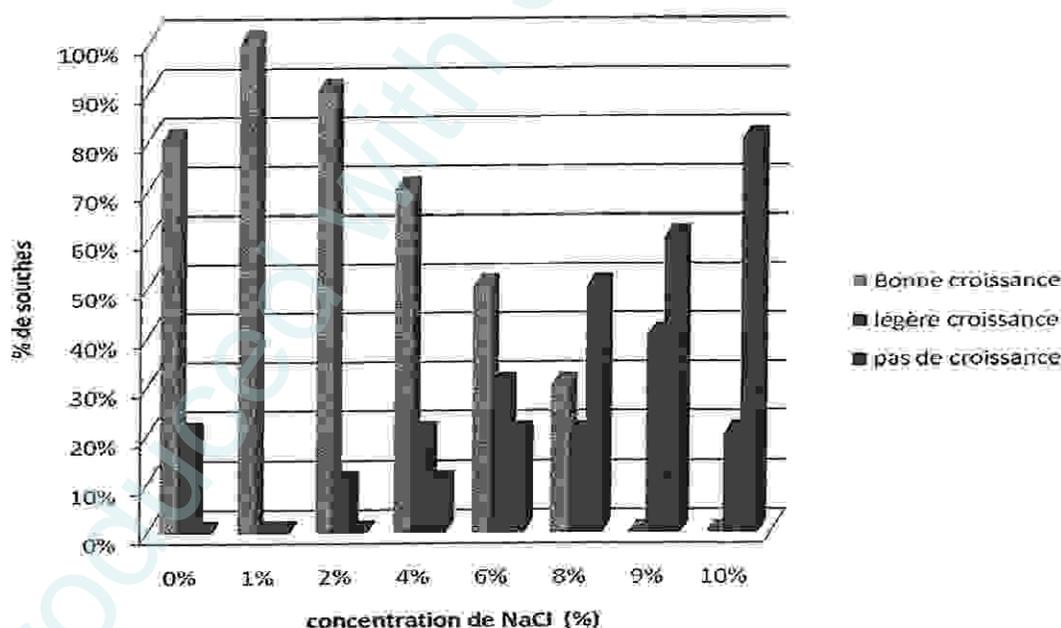
### ➤ Tolérance de la salinité:

La figure 27 montre les résultats obtenus concernant l'influence de la concentration en NaCl sur la croissance des isolats de pois chiche.

D'après la figure, nous remarquons que tous les isolats testés présentent une bonne ou légère croissance à des concentrations allant de 0% à 2% avec une bonne croissance pour toutes les souches observées pour une concentration de 1%.

Ainsi, nous constatons que 10 à 80% des isolats n'ont pas pu tolérer la salinité à des concentrations allant de 4% jusqu'à 10%. Remarquablement, les souches 02 et 09 ont pu tolérer une forte salinité à 10% qui correspond à une quantité de 1724 mM de NaCl.

Cette tolérance à la salinité très élevée a été signalée par plusieurs études dont celles de Maâtallah *et al.* (2002) qui ont pu identifier des isolats de pois chiche qui tolèrent une concentration de 5% en NaCl. De plus, les travaux d'Abdelmoumen *et al.* (1999) ont montré que les rhizobia nodulant le funegreck sont capables de croître à une concentration en NaCl allant jusqu'à 14% (2380 mM).



**Figure 27 : effet de salinité (NaCl) sur la croissance des souches nodulant le *Cicer arietinum* L.**

Cependant, les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Elsheikh et Wood, 1989 ; Rai, 1983) et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985).

➤ **La résistance aux antibiotiques :**

L'évaluation de la résistance des isolats aux différents antibiotiques testés est illustrée dans la figure ci-dessous.

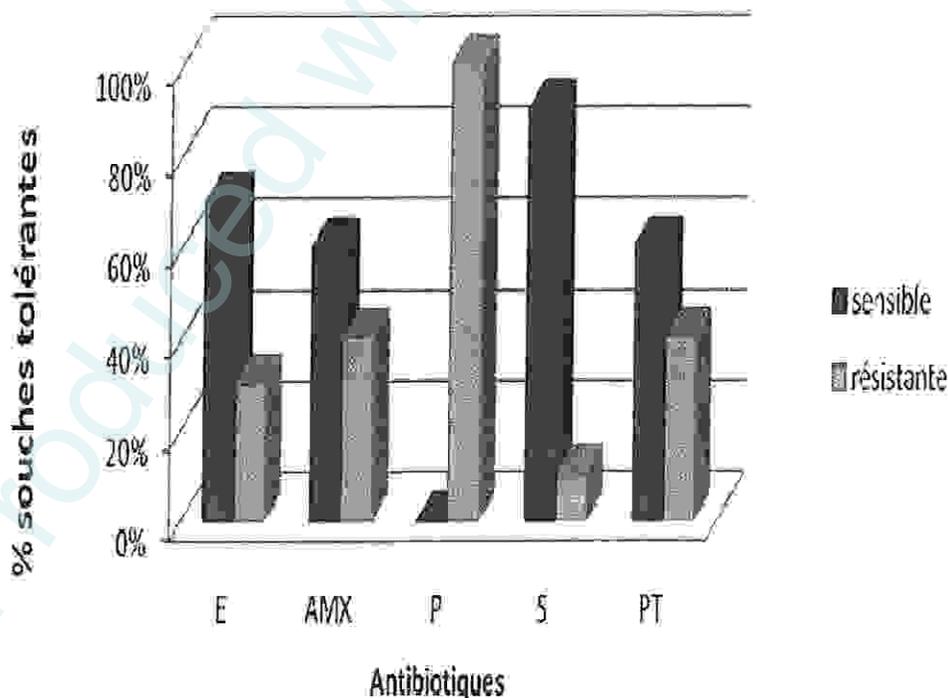
Les résultats indiquent que les souches montrent des résistances variables via les différents antibiotiques testés.

Nous remarquons que la totalité des souches ont montré une résistance à la *pénicilline* [6µg/ml]. Cependant, toutes les souches ont été sensibles pour le *sulfamide* [200µg/ml] à l'exception de la souche 08.

Les résultats révèlent également une sensibilité supérieure à 50% vis-à-vis de l'*erythromycine* [15µg /ml], l'*amoxiciline* [25µg/ml] et la *pristinamycine* [15µg/ml]. Notons que le degré de sensibilité a varié entre les souches et indiqué par la variation de la largeur de la zone d'inhibition.

La figure 37 illustre les résultats d'antibiogramme observés pour la souche 05 et 10 à titre d'exemple.

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.



**Figure 28 : effet des antibiotiques sur la croissance des isolats.**

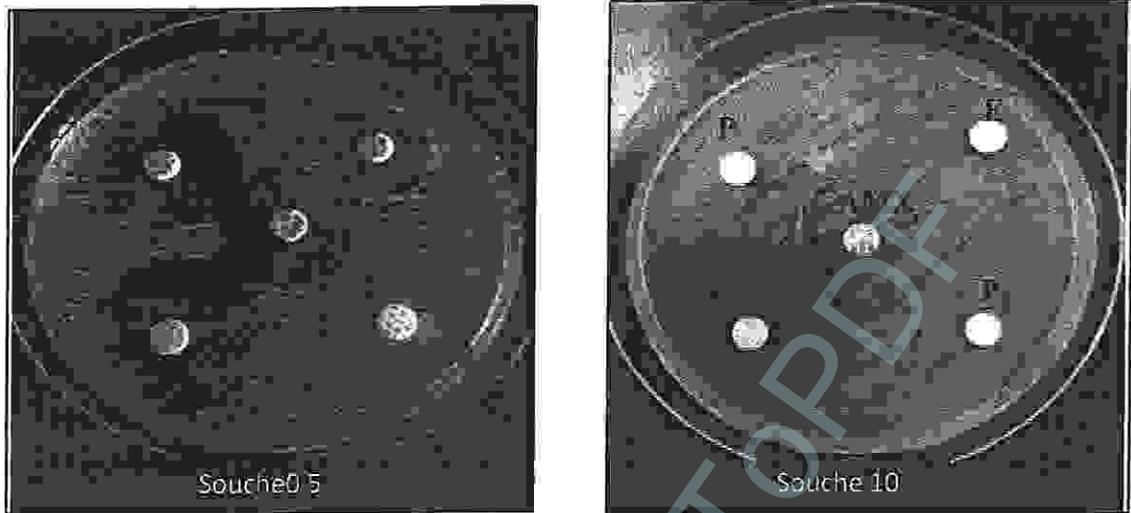


Figure 29 : résultats d'antibiogramme des souches 05 et 10.

➤ Tolérance aux métaux lourds:

Les résultats obtenus sur l'effet des différents métaux lourds testés sur la croissance des souches isolées de *Cicer arietinum* L. sont représentés dans la figure suivante.

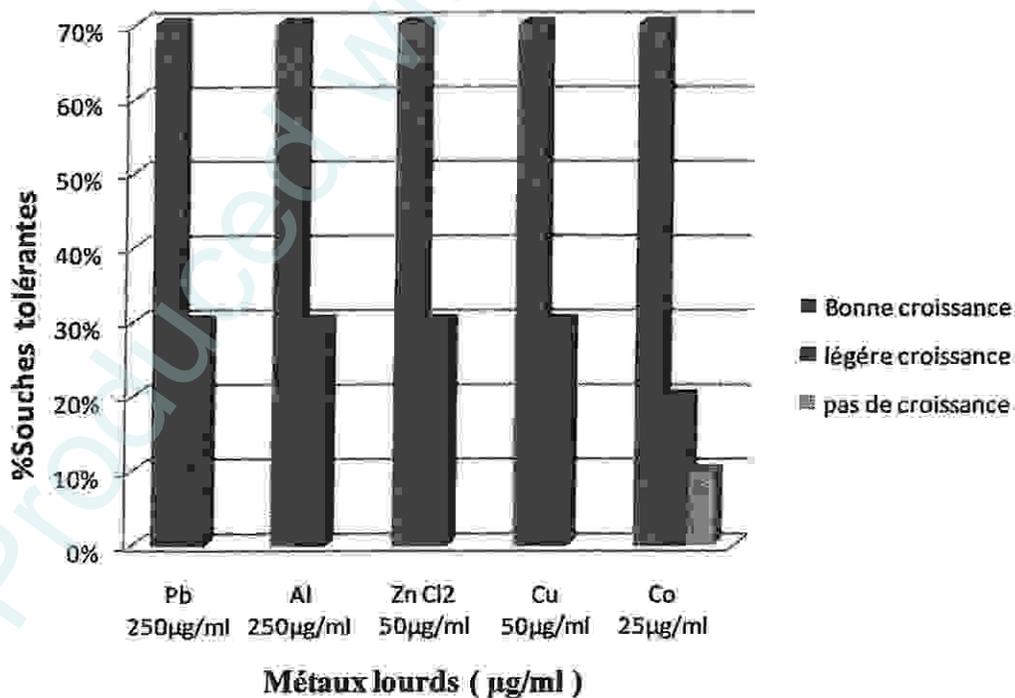


Figure 30 : effet des métaux lourds sur la croissance des isolats.

D'après cette figure, nous remarquons que 70 % des souches (01, 02, 03, 05, 07, 08,10) ont montre une bonne tolérance aux différents concentrations de métaux lourds testés.

Alors que les 30 %des souches (04, 06, 09) ont révélés une faible tolérance traduit par une légère croissance. A noter que la souche 5 n'a pas pu tolérer le Co à 25µg.

D'après ces résultats, on constat que toutes les souches testées ont été toléré aux métaux lourds. Cependant l'étude de Maâtallah et al. (2002) réalisée sur les isolats de pois chiche dans le sol marocain a montré que les isolats tolérants aux mêmes concentrations de métaux lourds ne dépassent pas les 50%.

### 5- Critères biochimiques :

#### ➤ Les Tests enzymatiques :

Les résultats obtenus concernant la présence des enzymes catalase et oxydase chez les isolats de pois chiche sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : les résultats de la mise en évidence de l'oxydase et la catalase.

Souche	Souche	Souche	Souche	Souche	Souche	Souche	Souche	Souche	Souche	Souche
Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Toutes les souches sont à catalase et à oxydase positive. Ces caractères sont décrit pour les rhizobia dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984).

### 6- Etude de l'infectivité des isolats:

Les résultats obtenus après cinq semaines de ce test ; montrent que les 10 souches testées ont été infectives vis-à-vis de leur plante hôte *Cicer arietinum* L. ; cultivar Flip 90-13. Selon Vincent (1970) et Date et Holliday (1987), ce résultats permet de vérifier l'appartenance des ces souches au groupe « rhizobia». Le nombre et l'aspect des nodules induits par nos souches sont récapitulés dans le tableau 6.

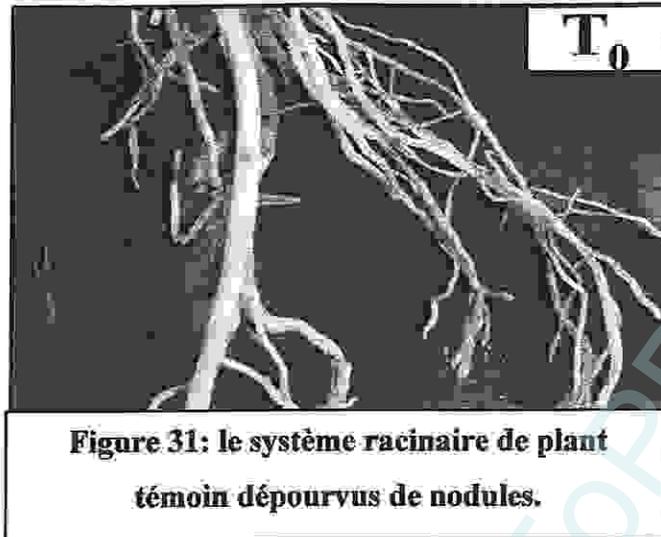
Tableau 6 : nombre, aspect et diamètre des nodules induits par les isolats.

souche	Plant	Nodules / plant	aspect des nodules		Diamètre des nodules
			gros nodules	Petit nodules	
01	1	26	5	11	1-6 mm
02	2	11	-	11	1 mm
03	3	37	3	34	1-5 mm
04	4	/	/	/	/
05	5	4	-	4	1mm
06	6	22	-	22	1mm
07	7	22	6	16	2-5 mm
08	8	8	-	8	1mm
09	9	3	-	3	1mm
10	10	22	4	18	1-5 mm
-	*T <sub>0</sub>	0	0	0	0

\*T<sub>0</sub> : non inoculé pour vérifier la stérilité du test.

*Remarque : le plant 04 a subi un flétrissement inexplicable au cours de l'expérience.*

Nous remarquons que la souche 03 a été la plus infective en induisant 37 nodules ; suivie par la souche 01 qui a donné 26 nodules. Cependant on remarque que les souches 05 et 09 ont été les moins infectives ont induisant 4 et 3 nodules respectivement. Ainsi le plant témoin (T<sub>0</sub>) n'a montré aucun nodule, ce qui prouve que le test a respecté les conditions recommandés (figure31).

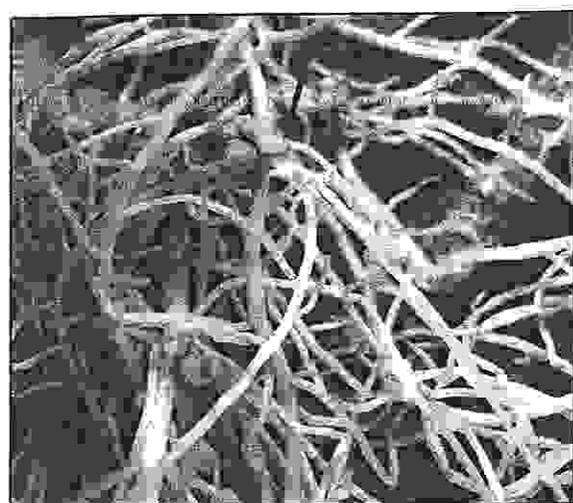


**Figure 31: le système racinaire de plant témoin dépourvus de nodules.**

Les nodules observés, ont révélé des tailles variables entre petits et gros nodules. Cependant, on remarque que la souche 01, 03, 07, 10 ont donné des nodosités de large taille allant jusqu'à 6 mm. Alors que, le reste des souches a induit des petits nodules de 1mm de large.

Selon Nour et *al.* (1994); Nour et *al.* (1995) et Zakhia et de Lajudie (2001) les espèces du genre *Mesorhizobium* sont à l'origine des gros nodules sur les racines de cette plante. En outre, les espèces du genre *Sinorhizobium* induisent des petits sur le plant de pois chiche. (Aouani et *al.*, 2001).

Nous remarquons également que les nodules induits sont de formes variées (rondes ou lobées) ayant une taille variables, de couleur marron ou blanche. Ce résultat, a été également observé par Aouani et *al.* (2001) qui ont trouvé une hétérogénéité dans la forme, la taille et la couleur des nodules de pois chiche.

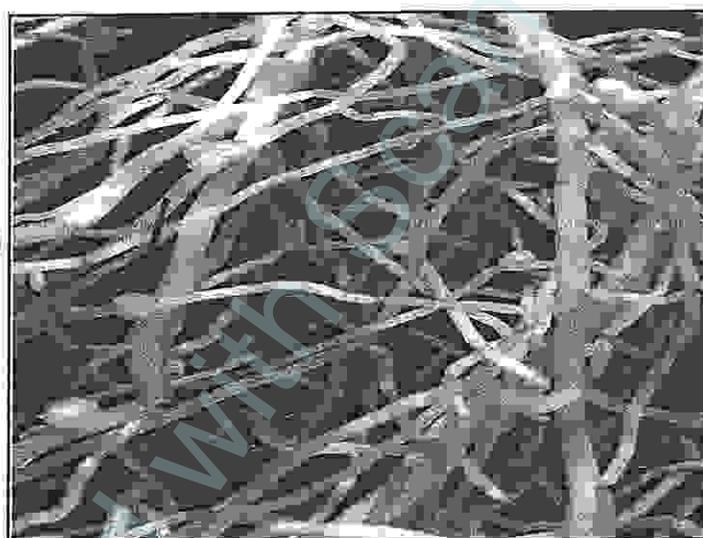


Plant 1



(a)

Plant 10



(b)

Plant 6

**Figure 32: l'aspect des nodules induit par les souches nodulantes ;  
(a) : les gros nodules ; (b) : les petits nodules ; les flèches montre les nodules.**

---

---

## Conclusion et perspectives :

Une meilleure connaissance des rhizobia nodulant le pois chiche dans le sol algérien, permet d'une part l'amélioration du rendement de cette légumineuse ; dont le besoin national dépend toujours de l'importation. Et d'autre part, d'augmenter la fertilité des terres agricoles.

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des bactéries symbiotiques nodulant *Cicer arietinum* L. dans la région de Guelma. Cette étude a permis de révéler une diversité phénotypique au sein d'une collection de dix souches isolées à partir des nodosités racinaires du pois chiche.

L'étude culturale et morphologique des isolats a montré des colonies mucilagineuses, laiteuses ou blanchâtres ; qui n'absorbe pas le colorant rouge de Congo. Ainsi, la coloration de Gram a révélé des courts bâtonnets à Gram négatif.

Le test de nodulation, a permis de vérifier l'inféctivité de ces souches vis-à-vis de leurs plante hôte. Ainsi, après cinq semaine de culture dans des conditions contrôlées, la collection des isolats ont été révéler nodulante ; faisant partie du groupe rhizobia.

L'analyse de certaines données phénotypiques nous a permis de repérer des souches très performantes :

- ✓ L'étude de la tolérance au pH a montré que les souches sont acido-alkali-tolérantes avec une tolérance remarquable pour une souche au pH1.
- ✓ L'étude de la tolérance à la température a révéler une croissance à un intervalle compris entre 10 et 40°C ; avec une tolérance remarquable a 45°C pour certaines souches.
- ✓ L'étude de la tolérance vis-à-vis des concentrations en NaCl a montré une hétérogénéité entre ces souches. Cependant, deux souches ont remarquablement toléré une concentration de 10%.
- ✓ L'étude de la résistance aux antibiotiques, a révéler une résistance à la pénicilline et une sensibilité au sulfamide.
- ✓ Enfin, la plupart des souches ont été tolérante vis-à-vis des métaux lourds testés.

---

---

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué, on peut noter :

- Étudier d'autres caractères phénotypiques dont l'assimilation des hydrates de carbones
- Mesurer l'activité nitrogénase des rhizobia isolés.
- Tester l'infectivité des isolats vis-à-vis de *Medicago sativa* (luzerne)
- Sélectionner la souche la plus effective pour produire des inoculums de bonne qualité.
- Identification des isolats par des techniques moléculaires.
- Réaliser une inoculation croisée avec *pisum sativum* (petit pois)

---

---

## Résumé:

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L) est une légumineuse capable d'établir une interaction symbiotique avec les rhizobia. Cette interaction est très spécifique, impliquant deux genres bactériens : le *Mesorhizobium* ; qui induit des gros nodules effectifs et le *Sinorhizobium* qui donne des petits nodules non fixateur d'azote.

Ce travail a été réalisé afin de caractériser phénotypiquement des micro-symbiotes nodulant *Cicer arietinum* L. Dix souches ont été isolées à partir des nodules de pois chiche ; cultivée à l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de la wilaya de Guelma.

Ces isolats ont subi une caractérisation cultural et microscopique. Suivie par une caractérisation physiologique qui a inclut une analyse de leur tolérance à la salinité, aux températures élevées, aux pH acides et alcalins, aux antibiotiques ainsi qu'aux métaux lourds. De plus, l'appartenance de ces isolats au rhizobia a été confirmée par le test de nodulation.

Les critères évalués ont permis de mettre en évidence une large diversité phénotypique au sein de ces populations de rhizobium nodulant le pois chiche.

**Mots clés :** *Mesorhizobium*, test de nodulation, pois chiche, caractères phénotypiques

Produced with ScanTopDF

---

---

## Summary:

Chickpea (*Cicer arietinum* L) is a legume capable of establishing a symbiotic interaction with rhizobia. This interaction is very specific, involving two bacterial genus: *Mesorhizobium*, which induces large nodules and effective *Sinorhizobium* which gives small nodules not fixing nitrogen.

This work has been conducted to characterize phenotypically micro-symbionts nodulating *Cicer arietinum* L. Ten strains were isolated from nodules of chickpea, grown at the Institute Technique des Grande Cultures (ITGC) in the wilaya of Guelma.

These isolates underwent cultural and microscopic characterization. Followed by physiological characterization that includes analysis of their tolerance to salinity, high temperature, acid and alkaline pH values, as well as antibiotic heavy metals. Moreover, membership of these rhizobia isolates was confirmed by testing nodulation.

The criteria evaluated were allowed to show a wide phenotypic diversity within these populations of rhizobia nodulating chickpea.

**Keywords:** *Mesorhizobium*, test nodulation, chickpea, phenotypic.

Produced with ScanPDF

## ملخص:

الحمص من الباقوليات له القدرة على إقامة تفاعل مع الريزوبيا التكافلية وهذا التفاعل هو محدد جدا ينطوي على اثنين من انواع البكتيريا : الميزوريزوبيا ، التي تكون العقد الجذرية الكبيرة و السينوريزوبيا تكون العقد الجذرية الصغيرة لتثبيت النيتروجين الجوي.

أجري هذا البحث لتحديد خصائصه الظاهرية و اختبار تكوين العقد الجذرية. حيث تم عزل عشرة عينات من العقد من الحمص ، التي اخذت من معهد تقنيات للزراعات الواسعة (ITGC) في ولاية قالمه. هذه العزلات خضعت للزرع و الملاحظة المجهرية تليها الدراسة الفيزيولوجية التي تشمل تحليل سماحية لدرجة الملوحة ودرجات الحرارة المرتفعة ، والتخثير في درجة الحموضة والقلوية ، فضلا عن المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة. و تأكيدا على ذلك ، فإن عضوية هذه الريزوبيا المعزولة عن طريق اختبار تكوين العقد والذي يسمح بتقييم و إظهار و تنوع واسع داخل المظهر و الشكل لريزوبيا الحمص.

كلمات المفتاح : الميزوريزوبيا ، اختبار تكوين العقد الجذرية ، الحمص ، المظهر.

## Annexes :

### **Milieu YEMA (Vincent, 1970) (g/l):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
Extrait de levure	1
Mannitol	10
Agar	20
Eau distillée	1000 ml
pH 6.9	

### **Milieu YEMA (Lajudie et al., 1998) (g/l):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeCl <sub>3</sub>	0.004
Glutamate de sodium	0.5
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Agar	20
Eau distillée	1000 ml
pH 6.9	

### **Milieu YEMA sans mannitol (g/l):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeCl <sub>3</sub>	0.004
Glutamate de sodium	0.5
Extrait de levure	1
Agar	20
Eau distillée	1000 ml
pH 6.9	

### **YMB (Yesat Mannitol Broth) (g/l):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeCl <sub>3</sub>	0.004
Glutamate de sodium	0.5
Extrait de levure	1
Eau distillée	1000 ml
pH 6.9	

**Tableau : le rôle des principaux composants de milieu YEMA.**

<i>Produit</i>	<i>Rôle</i>
$K_2HPO_4$	Source de $K^+$ et de $PO_4^{3-}$
$MgSO_4$	Source de $Mg^{+2}$ et de $SO_4^{-2}$
$NaCl$	Source de $Na^+$ et de $Cl^-$
Mannitol	Source carbonée
Extrait de levure	Source de protéines et vitamines

### **Préparation des milieux :**

- **Milieu YEMA 3 additionné de rouge Congo (Vincent., 1970)**

On rajoute 10 ml de la solution rouge Congo à 0.25% pour 1000 ml de milieu avant le stérilisé.

- **Milieu YEMA 3 additionné de bleu de Bromothymol (Vincent., 1970)**

On rajoute 5 ml de la solution bleu de bromothymol (BTB) pour 1000 ml de milieu avant le stérilisé.

- **Solution nutritive extrait du sol (g/l):**

Faire bouillir les 100g du sol (ramené du site d'échantillonnage ITGC) additionné de 1 litre d'eau distillé pendant 10 min puis laissé décompter.

## Références Bibliographiques :

### -A-

Abdelaly Hilali., Prévost Danielle., Broughton William. J et Hani Antoun. (2001). Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. Vol.47. 590-593 p.

Abdelmonmen H., Filali-Maltouf A., Neyra M., Belabed A et Missbah El Idrissi M. (1999). Effect of high salt concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol.* 86, 886-898.

Aouani M. E., Mhamdi R., Jebara M et Amargerb N. (2001). Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie.* 21:577-581.

Aveline A., Bodet J.M., Brad M., Carroue B., Calamy H., Conanec G., Crensat A., Delouche R., Dumont S., Jannot Ph., Justes F., Konassi A., Laurent F., Lecoq C., Gall A., Delliou L., Machet J., Mathys L., Combe D.M., Morvan T., Mouchart A., Nalin V., Ney B., Segaud L., Simon J.C., Guillaume T., Villard A et Wery J. (1999). Fertilisation azotée de trois légumineuses le haricot, la luzerne et le pois proteagineux. ,48p.

Ayisi., Putnam K. K. D. H., Vance C. P., et Graham P. H. (1992). Bradyrhizobium inoculation and nitrogen fertiliser effects on seed yield and protein of white lupin. *Agronomy.* 857-861 p.

### -B-

Bogusz D., Franche C. (1985). La Fixation biologique d'azote : l'OSTOM et les recherches fondamentales. Dakar. 15 p.

Boivin C., Lortet G., Lorquin J., Salif B.A., Méar N., Ferro M., De Lajudie P., Prome J. C. et Dreyfus B. (1998). Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums : application aux souches d'*Acacia* et de *Sesbania* du Sénégal. In *L'Acacia au Sénégal*, Campa C., Grignon C., Gueye M. & Hamon S. (eds.), pp. 378-386. Paris: ORSTOM.

Bordeleau L. M et Prévost D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation under extreme environments. *Plant and Soil*. 115-135 p.

Burton J. C. (1979). Microbial technology: Rhizobium species, Academic Press, Inc. pp.29-58 .

-C-

Chataigné G. (2007). Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Chimie-Biologie-Santé. Université Toulouse III- Paul Sabatier.

Chen W. X., Yan G. H et Li J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned by *Sinorhizobium* .392-397.

Cheng T. C. (1991). Is parasitism symbiosis? A definition of terms and evolution of concepts. In: *Parasite-host associations, coexistence or conflict?* C.A. Toft, A. Aeschlimann & L. Bolis. Oxford University Press, New York. 15-36.

-D-

Date R. A. et Halliday J. (1987). Collection and maintenance of rhizobia. In *symbiotic nitrogen fixation technology*, ELKAM G. H. (ed.), 14-24 p.

Dean D.R., Bean J., Zheng L. (1993). Nitrogenase metalloclusters: structure organization and synthesis .*bacteriol*.175, 6737-6744.

Delarras C. (1998). Microbiologie, 90 heures de travaux pratiques, pp. 56-125. Ed. Gaëtan Morin Europe.

Djebali N. (2008). Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. Université de Toulouse. 209 p.

Dommergues. Y., Duhoux. E. et Diem. H. G. (1999). Etablissement et fonctionnement des symbioses rhizobiennes. In *Les arbres fixateurs d'azote*, Ed. Espaces. 34. 1-30 p.

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

Duhoux Eet Nicole. M. (2004). Atlas de Biologie végétale : associations et interactions chez les plantes. Ed. DUNOD, Paris.

-E -

Eady R. R. (1986). Enzymology in free –living diazotrophs .In: W.J.Broughton and A.Puhler, Nitrogen fixation (molecular biology) Clarendon Press, Oxford. 1-49 p.

Eaglesham A. R. J ., Ayanaba. A. (1984). Tropical stress ecology of rhizobia, rootnodulation and legume fixation, p. 1-35. In N. S. Subba Rao (ed.), Current developments in biological nitrogen fixation. Edward Arnold Publishers, London, United Kingdom.

El-Hilali Ibtissam. (2006). La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des Microsymbiotes et mise en évidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*. Biologie, Université Mohammed V-AGDAL faculté des sciences Rabat. 231p.

El-sheikh E. A. E., Wood M. (1989). Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21, 889-895.

Ernst W. H. O. (1990). Mine vegetation in Europe, In A. J. Shaw (ed.), Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 21.

-F-

Fisher R. F., Egelhoff T. T., Mulligan J. T. et Long S. R. (1988). Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing Nod D to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes & Development*. 282-293.

Fred E. B., Baldwin I. L. et Mc Coy E. (1932). *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. University of Wisconsin Press. 343 p.

Franssen H. J., Nap J. P. et Bisseling T. (1992). Nodulins in root nodule development. In *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey G., Burris B. & Evans H. J. (eds.), pp. 598-624, Chapman & Hall New York.

-G-

Giraud E. (2007). Symbiose rhizobium/légumineuse : un nouveau sésame. Vol. 23, N° 6-7, 4p.

Godfroy O. (2008). Etudes génétique et moléculaire de deux gènes de *Medicago truncatula*, DMI3 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires, *Biosciences végétales*, Université de Toulouse, 232p.

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

Gordon M. (2006). Pois chiches : situation et perspectives. *Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada*. Vol 19, n°13.

Gough C. (2003). *Rhizobium* symbiosis: insight into Nod factor receptors. *Current Biology*, 13 (24): R973-975.

Graham P.H. (1964). Studies on the utilization of carbo-hydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek*. 30, 68-72.

Graham, P. H., Sadowsky M. J., Kersters H. H., Barnett Y. M., Bradley R. S., Cooper J. E., De Ley D. J., Jarvis B. D. W., Roslycky E. B., Strijdom B. W. et Young J. P. W. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 582-587.

Graham P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38, 475-484.

Guillaume Dufresne. (2004). Valorisation de matière résiduelles pour la production de biofertilisants à base de *Rhizobium* : optimisation du procédé de fermentation avec *Sinorhizobium Mililoti*. 146P.

#### -H-

Hirsch A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation *New Phytologist*, 122 (2): 211-237.

Hopkins W.G. (2003). *Physiologie Végétale*. Ed: de boeck. 99-116 P.

Howieson J. G., Fillery I. R. P., Legocki A. B., Sikorski M. M., Strepkowsky T., Minchin F. R. et Dilworth. M. J. (1998). Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. 149-180 p.

#### -I-

Indge B. (2000). The Nitrogen Cycle. *Biological Sciences Review*, Vol. 13, p25-27.

#### -J-

Jordan D. C. (1984). Family III: *Rhizobiaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Krieg N. R. & Holt J. G. (eds.), vol. 1, 234-242 p.

-K-

Kassem M., Capellano A., et Gounot A. M. (1985). Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN J.* 1, 63-65.

Kurlovich B. S., Tikhonovich I. A., Kartuzova L. T., et Kozhemyakov A. P. (1997). Trends and methods of lupine breeding for increasing level of symbiotic nitrogen fixation. 39-47 p.

-L-

Lajudie (de) P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M. P., Dreyfus B et Gillis M. (1998). Characterization of tropical tree rhizobium and description of *Mesorhizobium pulrifarium* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 369-382.

Laplaze L., Gherbi H., Frutz T., Pawlowski K., Franche C., Macheix J.J., Auguy F., Bogusz D et Duhoux E. (1999). Flavan-containing cells delimit Frankia-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. *Plant Physiology.* 113-122 p.

Lipsanen P., Lindström K. (1989). Lipopolysaccharides and protein patterns of *Rhizobium* sp. (*Galega*). *FEMS Microbiol. Lett.* 58, 323-328.

-M-

Maâtallah J., Berraho E. B., Sanjuan J et Luch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils.

Melakhessou Z. (2007). Etude de la nuisibilité directe des adventices sur la culture de pois -chiche d'hiver (*Cicer arietinum*L) variété ILC 3279, cas de *Sinapis arvensis* L. Agrotechnie. Université El-Hadj Lakhdar-Batna, 72p.

Missbah El Idrissi M., N. Anajjar, A. Belabed, Y. Dessaux, and A. Filali-Maltouf. (1996). Characterization of rhizobia isolated from carob tree (*Ceratonia siliqua*) *J. Appl. Bacteriol.* 80, 165-173.

Moawad H., et D. Beck. (1991). Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field-grown lentil. *Soil Biol. Biochem.* 23, 917-925.

-N-

Newton W.E (1993). nitrogenous : distribution , composition ,structure and function .in : New Horizons in Nitrogen Fixation .Dordrecht .5-18.

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

Nour S.M., Fernandez M.P., Normand P et Cleyet-Marel J. C. (1995). Genotypic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 640–648.

-O-

Oke V., Long S. R. (1999). Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology.* 641–646p.

-P-

Pawlowski K et Bisseling T (1996). Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell.* 8: 1899-1913.

Peduzzi R et Renata Boucher-Rodoni. (2001). Symbiose des organismes aquatiques et terrestres. Ecole d'Eté Fiora. 78P.

Pelmont J. (1992). Azote, symbiose, contrôles. In *Bactéries et environnement : adaptations physiologiques*, pp. 541-574. Eds. Collection Grenoble Sciences.

Perret X., Staehelin C. et Broughton W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (1): 180-201p.

Peret B. (2007). Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. *Physiologie végétale*. Université Montpellier II. 77P.

Prin Y., Galiana G., Ducouso M., Dupuy N., Philippe de Lajudie., Neyra M. (1993). Les Rhizobiums d'acacia biodiversité et taxonomie. 4<sup>e</sup> trimestre. N° 238. 5-20 p.

-R-

Rahajaharitombo R. L. (2004). Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des hautes terres de Madagascar, Université d'Antananarivo, 213P.

Rai R. (1983). The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect of salinity on the aspects of symbiotic N-fixation. *J. Agric. Sci.* 100, 81-86.

Roger P., Dommergues Y., Balandreau J., Dreyfus B. (1996). La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement. 34P.

Rostas K., Kondorosi E., Horvath B., Simonsits A et Kondorosi A. (1986). Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 83 (6): 1757-1761.

Sahgal M et Johri B. N. (2003). The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*. 43-84 p.

Schlaman H. R. M., Phillips D. A. et Kondorosí E. (1998). Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In *The Rhizobiaceae*.

Singleton P. W., El Swaify S. A., et Bohlool B. B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 884-890.

Spichiger R. E., Chen W. et Gillis M. (2002). *Leguminosea*. In *Botanique systématique des plantes à fleurs*, pp. 202-204. Ed. Presses polytechniques et universitaires Romandes.

Sprent J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*. 11-25p.

Steinkellner S., Lenzemo V., Langer I., Schweiger P., Khaosaad T., Toussaint J.P. et Vierheilig H. (2007). Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plantfungus interactions. *Molecules*, 12 (7): 1290-1306.

Van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J. and Kijne, J.W. (1992). Induction of Pre-Infection Thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*, 257 (5066): 70-72.

Vander Maessen L.J.C (1972). Cicer L, a monograph of genus , with special reference to the chickpea (Cicer arietinum L.) its ecology and cultivation , Meddeling land bouw bog school wagenigen, Nederland, 7p.

Vincent J. M. (1970). The Cultivation, isolation and maintenance of *Rhizobia*. In *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*, ed: I. B. P. Handbook. 1-13 p.

-W-

Waligora C., Thierry Tetu. (2008). Légumineuse, il est urgent de les réhabiliter. N°48. 12-22p.

Wall, L.G. (2000). The Actinorhizal Symbiosis. Journal of Plant Growth Regulation. 167-182 p.

-Z-

Zahran H. H., Räsänen L. A., Karsisto K., et Lindström K. (1994). Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-Page of rhizobia by osmotic and heat stress. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 100-105.

Zakhia F et De Lajndie P. (2001). Taxonomy of *rhizobia*. *Agronomie.* 21: 569-576.

### Les sites web:

Site 1: [www.cegep-ste-botaniqueno](http://www.cegep-ste-botaniqueno)

Site 2: [www.wikipedia.org/Pois\\_chiche](http://www.wikipedia.org/Pois_chiche)

Site 3: [www.images.google.com](http://www.images.google.com)

Site 4: [www.natureworks-SF.net/Cicerarietinum](http://www.natureworks-SF.net/Cicerarietinum)