

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : biologie moléculaire et cellulaire
Département : Biologie

Thème

**Etude de l'effet des facteurs abiotiques sur les bactéries nodulant
les légumineuses**

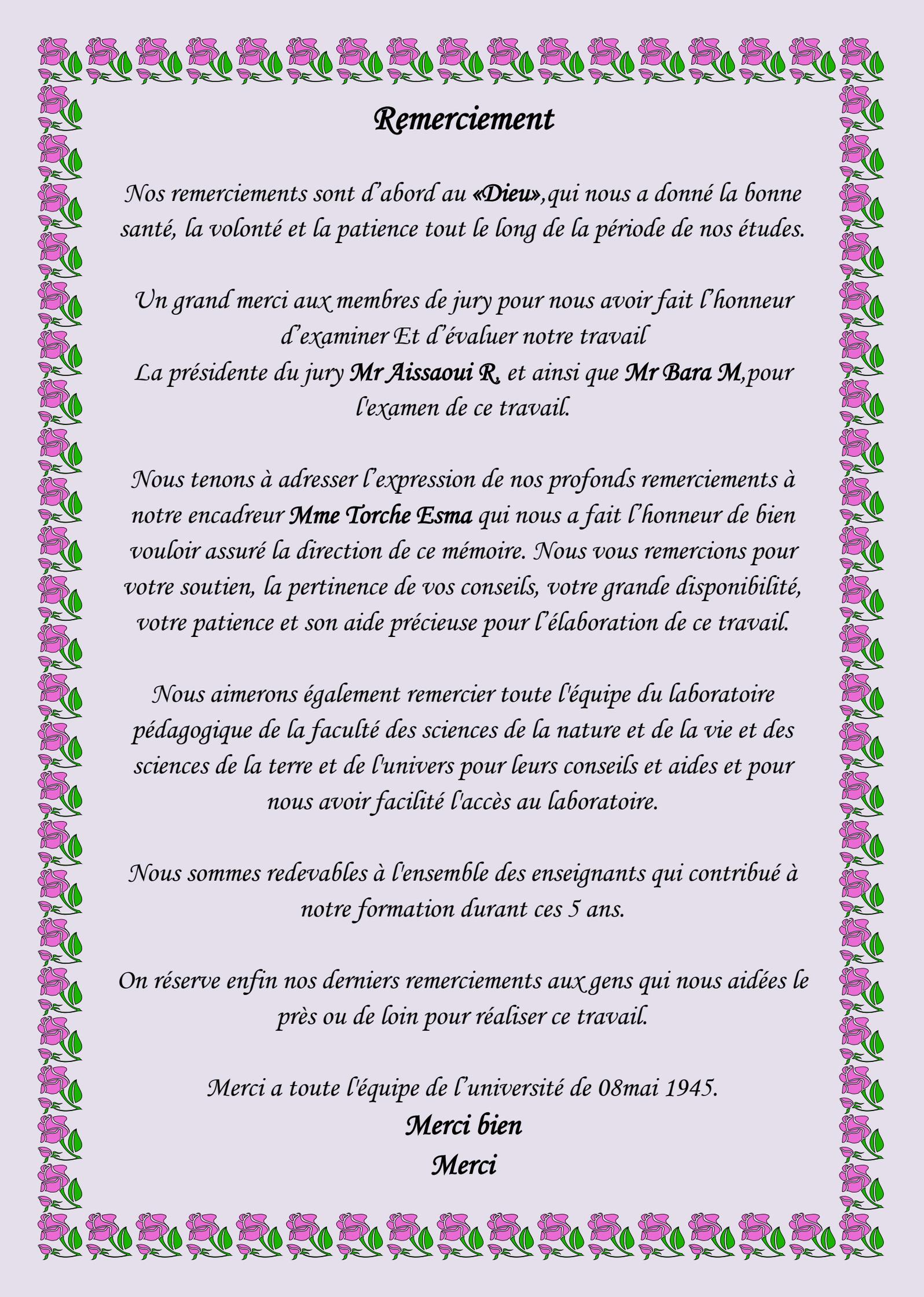
Présenté par :

-BEKAKRIA Somia
-HEMAIDIA Sawssen
-REGHAISSIA Nour el Houda

Devant la commission composée de :

Président(e) : Mr AISSAOUI Riyad	M.C.B	Université de Guelma
Examineur : Mr BARA Mouslim	M.C.A	Université de Guelma
Encadreur : Mme TORCHE Esmâ	M.C.B	Université de Guelma

Juillet 2019



Remerciement

Nos remerciements sont d'abord au «Dieu», qui nous a donné la bonne santé, la volonté et la patience tout le long de la période de nos études.

Un grand merci aux membres de jury pour nous avoir fait l'honneur d'examiner Et d'évaluer notre travail

*La présidente du jury **Mr Aissaoui R**, et ainsi que **Mr Bara M**, pour l'examen de ce travail.*

*Nous tenons à adresser l'expression de nos profonds remerciements à notre encadreur **Mme Torche Esma** qui nous a fait l'honneur de bien vouloir assuré la direction de ce mémoire. Nous vous remercions pour votre soutien, la pertinence de vos conseils, votre grande disponibilité, votre patience et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.*

Nous aimerons également remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers pour leurs conseils et aides et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire.

Nous sommes redevables à l'ensemble des enseignants qui contribué à notre formation durant ces 5 ans.

On réserve enfin nos derniers remerciements aux gens qui nous aidées le près ou de loin pour réaliser ce travail.

Merci a toute l'équipe de l'université de 08mai 1945.

Merci bien

Merci



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail :

A mon très cher père au monde «Mohamed»

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estimation, le développement et le respect que j'ai toujours en pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

A ma très chère mère au monde «Wassila»

Que je ne cesserai jamais de remercier pour son soutien et son encouragement durant mes années d'étude, et aussi pour son sacrifice, sa patience sans limite et l'éducation qu'il m'a donnée. Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me La garder.

A mes très chères sœurs Imane, Hanane, Assia, Fella

A mon très cher frère : Abd Alraouf

A ma grand-mère et tous les membres de ma famille «Bekakria » qui m'ont aidée chacun de son côté. Mes tantes et mes oncles, mes cousines et cousins.

A mon marié : Ibrahime

A mon trinôme

Sawssen, Nour El Houda pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu vous protègez et un grand merci à mes proches Chifa et Abd el Wadoud pour leur encouragement continue

A mes chères amies

Pour les bons moments qu'en a passés dans tous les spécialités : BMC, QPSA, Microbiologie Appliquée, immunologie, Ecologie de l'environnement.

A tous les étudiants de la promotion 2019

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.

 Somias



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail :

*A mon très chère père au monde «**Abd Allah**»*

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estimation, le développement et le respect que j'ai toujours en pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

*A ma très chère mère au monde «**Fatima**»*

Que je ne cesserai jamais de remercier pour son soutien et son encouragement durant mes années d'étude, et aussi pour son sacrifice, sa patience sans limite et l'éducation qu'il m'a donnée. Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder.

*A ma très chère sœur **Sana** que j'adore*

*A mes chères frères : **Mohamed Khalil et Abd Algafoure***

A ma grand-mère et tous les membres de ma famille qui m'ont aidée chacun de son côté. Mes tantes et mes oncles, mes cousines et cousins.

*A toute ma grande famille : **Hemaïdia***

*A mon fiancé : **Samir***

A mon trinôme

Soumia et Nour el Houda pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu vous protège.

A mes chères amies

Pour les bons moments qu'en a passés dans tous les spécialités : BMC, QPSA, Microbiologie Appliquée, immunologie, Ecologie de l'environnement.

A tous les étudiants de la promotion 2019

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.

*☞ **Sawssen** ☞*



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail :

A mon très chère père au monde «Nacer»

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estimation, le développement et le respect que j'ai toujours en pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

A ma très chère mère au monde «Sabiha»

Que je ne cesserai jamais de remercier pour son soutien et son encouragement durant mes années d'étude, et aussi pour son sacrifice, sa patience sans limite et l'éducation qu'il m'a donnée. Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder.

A mes très chères sœur Malak, Innes, Anfelle.

A mes très chers frères : Mohamed Iyad et Abd Alraouf

A ma grand-mère et tous les membres de ma famille qui m'ont aidée chacun de son côté. Mes tantes et mes oncles, mes cousines et cousins.

A toute ma grande famille : Reghaissia

A mon marié : Ilyes

A mon trinôme

Soumia et Sawwsen pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu vous protège.

A mes chères amies

Pour les bons moments qu'en a passés dans tous les spécialités : BMC, QPSA, Microbiologie Appliquée, immunologie, Ecologie de l'environnement.

A tous les étudiants de la promotion 2019

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.

🌀 Nour el Houda 🌀

Résumé

Les facteurs abiotiques (T° , pH et NaCl) ont un effet important dans le sol. Le but de notre recherche est d'étudier les effets des facteurs abiotique sur la croissance des bactéries nodulant les légumineuses (BNL) et sur la nodulation .Après un isolement des bactéries à partir des nodules racinaires et faire une étude morphologique culturale et microscopique, nous avons testé l'effet de la température, pH et NaCl sur la croissance des isolats et les souches de référence. Un test de nodulation est réalisé pour voir l'effet de NaCl sur la nodulation et sur la relation symbiotique. Les résultats obtenus montrent que les souches isolées peuvent croitre dans des intervalles de température allant de 4°C jusqu'à 50°C , résistent les concentrations élevée du NaCl. Avec une différenciation dans le comportement par rapport au pH. Pour le test de nodulation, les résultats de la nodulation démontrent que les plantes sont sensibles à l'action de NaCl et un arrêt de croissance est enregistré dans les concentrations élevées de NaCl.

Mots clé : *Rhizobium*, nodulation, facteurs abiotiques, BNL

Abstract

Abiotic factors (temperature, pH and NaCl) have a significant effect on the soil. The aim of our study is to study the effects of abiotic factors on the growth of leguminous nodulating bacteria and on nodulation. After isolation of bacteria and identification, we tested the effect of pH and NaCl on growth. A nodulation test is performed to see the effect of NaCl on the symbiotic relationship. This study is done in the presence of rhizobia reference strains. The results obtained show that the isolated strains behave in the same way as the controls with respect to temperature and NaCl, but do not have the same profiles from the point of view of pH. then the nodulation is effected by the high concentrations of NaCl.

Key words : *Rhizobium*, nodulation, abiotic factors, nodulating bacteria legumes.

المخلص

العوامل اللاحيوية (حرارة-ملوحة-حموضة) لها تأثير مهم في التربة.الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير العوامل اللاحيوية على نمو البكتيريا المكونة للعقد الجذرية للبقوليات وعلى تكوين العقد الجذرية بعد عزل البكتيريا من العقد الجذرية وإجراء دراسة مرفولوجية تنموية ومجهرية قمنا باختبار تأثير الحرارة، الحموضة والملوحة على نمو العزلات والسلالات الشاهدة. تم اجراء اختبار تكوين العقد الجذرية لمعرفة تأثير الملوحة على تكوين العقد الجذرية وعلى علاقة التعايش.النتائج المحصل عليها بينت أن السلالات المعزولة بإمكانها النمو في مجال الحرارة بين 4 و50م° وتتحمل تراكيز عالية من الملح مع تفاوت في السلوك بالنسبة للحموضة. أما بالنسبة لاختبار العقد الجذرية أظهرت النتائج ان النباتات أكثر حساسية لتأثير الحموضة مع ملاحظة توقف نمو في التراكيز العالية.

الكلمات المفتاحية: ريزوبيوم , بكتيريا مكونة للعقد الجذرية, عوامل لاهيوية, عقد جذرية.

Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
BCP:	Bromocrésol Pourpre
BNL:	bactéries nodulant les légumineuses
BTB:	Bleu de Bromothymol
C°:	Degré Celsius
CaCl₂:	chlorure de calcium
DO:	densité optique
EPS:	Exopolysaccharide
Fe Mo:	Fer molybdene
Fix:	Phénotype dans lequel les symbiosome fixent l'azote
g/l:	gramme par litre
GPA:	Glucose Peptone Agar
hsn:	Gène de la spécificité de d'hôte
ml:	milli-litre
mM :	milli-Molaire
N :	azote
NaCl:	Chlorure de sodium
NH₃⁻:	Nitrate
NH₄⁺:	Ammonium
Nif:	Nitrogène de fixation
nm :	nanomètre
NO₂⁻:	Nitrite
Nod:	Gène de nodulation

pH:	potentiel hydrogène
Psym:	Plasmide symbiotique
%:	Pourcentage
RC:	Rouge Congo
T°:	Température
YMA:	Yeast Mannitol Agar
YMB:	Yeast Mannitol Broth

Liste des figures

Numéro	Titre	page
Figure 01 :	cycle de l'azote	04
Figure 02 :	Schéma général de la symbiose	18
Figure 03 :	Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante	20
Figure 04 :	Conservation des nodules sous CaCl ₂	23
Figure 05 :	Ensemencement par la technique des quatre cadrans	24
Figure 06 :	germination des graines sur milieu TYA.	27
Figure 07 :	dispositif utilisé pour le test de nodulation	28
Figure 08 :	Croissance des souches sur le milieu YMA	29
Figure 09 :	Croissance des souches sur le milieu YMA-RC	29
Figure 10 :	Croissance des souches sur GPA+BCP	30
Figure 11 :	Croissance des souches sur le milieu YMA+BTB	31
Figure 12 :	Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100)	31
Figure 13 :	Effet de pH sur les souches étudiées après 24h	34
Figure 14 :	Effet de pH sur les souches étudiées après 48h	35
Figure 15 :	Effet du NaCl sur la croissance de toutes souches testées après 24h.	37
Figure 16 :	Effet du NaCl sur la croissance de toutes souches testées après 48h.	38
Figure 17 :	Test de nodulation (absence des nodules racinaires)	39

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 01 :	classification des <i>rhizobiums</i>	10
Tableau 02 :	souches utilisées dans notre étude	26
Tableau 03 :	effet de la température sur la croissance des bactéries	32

Table des matières

Remerciement

Résumé

Abstract

المخلص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction.....1

Chapitre I : Revue bibliographique

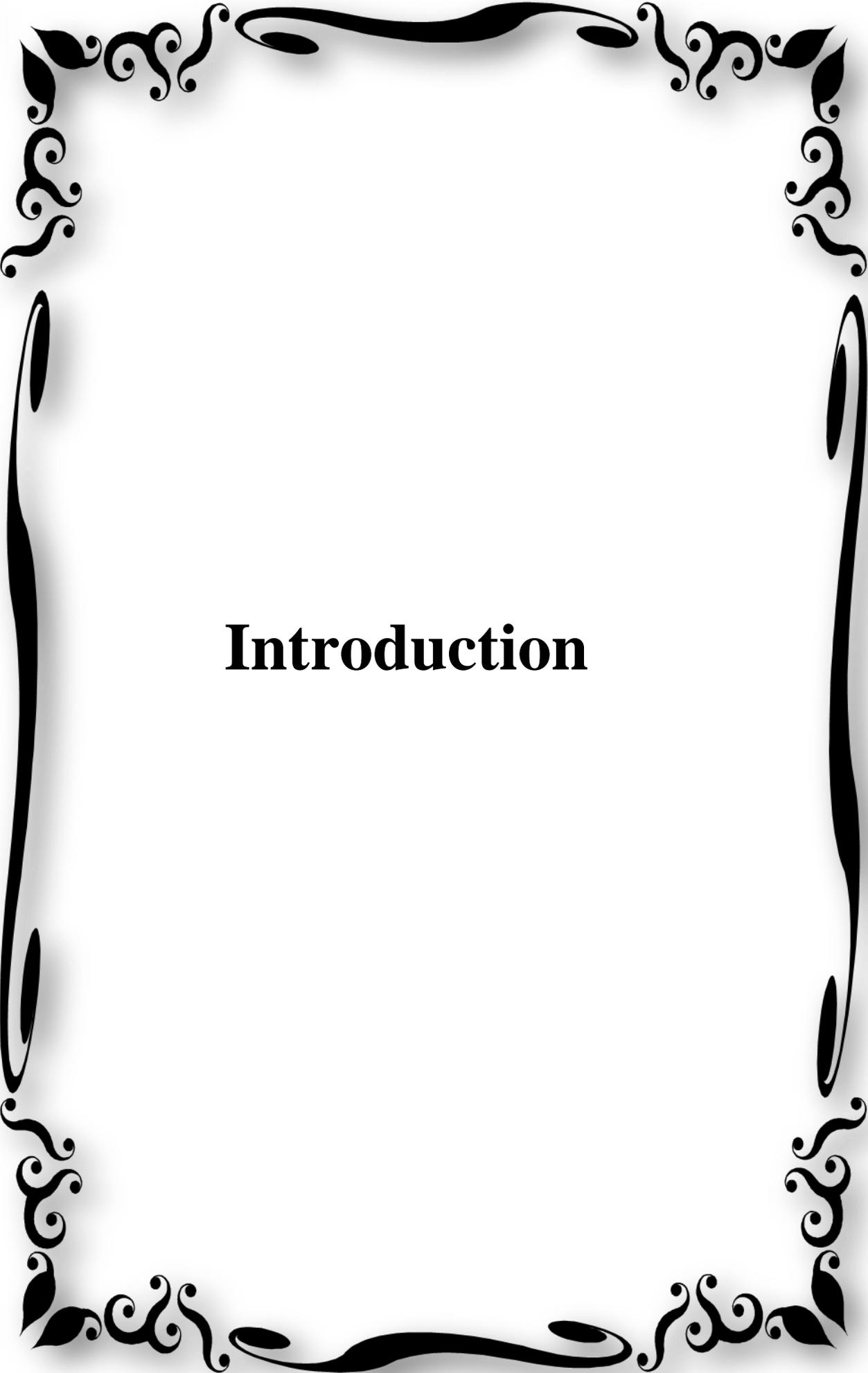
1. L'azote dans la nature.....	3
2. Cycle d'azote.....	4
2.1. Fixation de l'azote.....	5
2.2. Ammonification.....	5
2.3. Nitrification.....	5
2.4. Dénitrification.....	5
3. Fixation biologique de l'azote.....	5
3.1. Fixateurs libres.....	6
3.2. Fixateurs symbiotique.....	6
4. Partenaires de la symbiose fixatrice d'azote.....	7
4.1. Partenaires végétal : Les légumineuses.....	7
4.1.1. Généralités.....	7
4.1.2. Classification.....	7
4.1.3. Intérêts des légumineuses.....	8
4.2. Partenaire bactérien : les rhizobia.....	9

4.2.1.	Caractères morphologiques.....	9
4.2.2.	Caractères biochimiques	10
4.2.3.	Caractères physiologiques	10
4.2.4.	Caractères culturaux.....	10
4.2.5.	Caractères moléculaires	10
4.2.6.	Classification.....	10
5.	Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique.....	13
6.	Nodulation	14
6.1.	Génétique de la nodulation chez les bactéries	15
6.1.1.	Gènes <i>nod</i>	15
6.1.2.	Gènes <i>nif</i>	15
6.1.3.	Gènes <i>fix</i>	16
6.1.4.	Autres gènes.....	16
6.2.	Génétique de la nodulation chez la plante	16
6.3.	Substances responsables de la nodulation.....	16
6.3.1.	Flavonoïdes	16
6.3.2.	Facteurs Nod	17
6.3.3.	Autres substances.....	17
6.4.	Processus de nodulation.....	18
6.4.1.	Pré échange de signal	18
6.4.2.	L'infection.....	19
6.4.3.	Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	19
7.	Effet des facteurs abiotique sur la symbiose	20
7.1.	Effet du pH.....	20

7.2. Effet de la température.....	21
7.3. Effet du NaCl.....	21
8. Mécanismes d'adaptation au stress salin.....	22
8.1. Chez les bactéries.....	22
8.2. Chez les plantes.....	22
Chapitre II : matériels et méthode	
1. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	23
1.1. Collecte des nodules	23
1.2. Isolement des bactéries à partir des nodules	24
1.2.1. Stérilisation des nodules	24
1.2.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés.....	24
2. Etude morphologique des isolats	25
2.1. Caractères culturaux.....	25
2.2. Examen microscopique par coloration de Gram.....	25
3. Conservation des souches.....	26
4. Effet des facteurs abiotiques sur les souches bactériennes	26
4.1. Température	26
4.2. Effet du pH.....	27
4.3. Effet du NaCl.....	27
5. Effet du NaCl sur la nodulation	27
5.1. Stérilisation des graines	27
5.2. Germination des graines	27
5.3. Préparation des plantules et inoculation	28

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Etude morphologique des isolats	29
1.1. Caractères culturaux.....	29
1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram.....	31
2. Effet des facteurs abiotiques sur les souches bactériennes	31
2.1. Température	31
2.2. Effet du pH.....	33
2.3. Effet du NaCl	36
3. Effet du NaCl sur la nodulation	39
Conclusion	41
Références bibliographiques	43
Annexe	

A decorative border with intricate scrollwork and floral motifs surrounds the central text. The border is composed of four main sections, one for each side, with ornate corner pieces. The top and bottom sections feature long, flowing horizontal scrolls, while the left and right sections are more vertical with smaller, repeating scroll patterns.

Introduction

Introduction

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus qui permet de fixer l'azote moléculaire de l'air et le transformer par l'intervention des micro-organismes vivant dans le sol en des formes assimilables par la plante (**Hopkins, 2003**). La moitié de la fixation biologique de N_2 est réalisée par symbiose avec les plantes. En effet, cette symbiose fournit l'azote nécessaire pour la croissance et le développement de la plante et contribue à l'amélioration du bilan azoté des sols (**Latrach et al., 2014**).

La majeure partie de cet azote est apporté par la symbiose légumineuses-rhizobia. Les rhizobia sont des bactéries du sol capables d'induire une nodulation racinaires ou caulinaires et de coloniser les cellules végétales pour ensuite y fixer l'azote atmosphérique. Par conséquent, la symbiose rhizobienne pourrait, par la culture des légumineuses, dispenser les agriculteurs de la fertilisation chimique coûteuse et polluante. (**Zahran, 1999**).

En plus du rôle que les légumineuses jouent dans l'agriculture, l'économie et dans les balances alimentaires de nombreuses populations humaines, elles sont aussi très importantes écologiquement vu qu'elles sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables. La réduction de l'azote est réalisée généralement au niveau des racines des plantes dans des organes spécialisés appelées nodosités. Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. En retour, les bactéries tirent profit de l'interaction symbiotique en obtenant des hydrates de carbone produits par la plante pendant la photosynthèse (**Gaid, 2015**).

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien. Elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées (**Ouslim, 2016**).

Contrairement aux animaux, les plantes ne peuvent pas migrer lorsque les conditions de vie leur sont défavorables, naturellement, elles doivent donc s'adapter pour faire face aux agressions biotique et abiotique, elles mettent donc en œuvre des stratégies d'adaptation de défense aux stress, Les stress abiotiques regroupent la sécheresse, les températures extrêmes (froid et chaleur), la salinité. Les conditions de stress abiotiques nuisent à la croissance des plantes et au rendement des cultures (**Arous., 2009**).

La plante légumineuse de genre *Lotus* une plante herbacée, vivace et basse. Il possède des feuilles munies de cinq folioles ovales. Les deux basales ressemblent à des stipules. La couleur des fleurs varie du jaune au jaune-orangé et leur forme n'est pas sans rappeler celle du papillon (1).

En Algérie, le genre *Lotus* est représenté par 26 taxons qui se rencontrent en majorité et fréquemment au niveau de la frange littorale et les hauts-plateaux du pays sous des régimes climatiques allant du semi-aride à l'humide en allant d'Ouest en Est (Quezel et Santa, 1962).

En raison de leur capacité à former une symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia, les représentants du genre *Lotus* sont des plantes pionnières et une source de biomasse riche en protéines, ce qui leur confère un intérêt écologique et agropastoral (Djoudi et al., 2017)

Notre travail est basé sur l'étude de l'effet des facteurs abiotiques (pH, Température et NaCl) sur la croissance des bactéries nodulant la légumineuse du genre *lotus* et sur la nodulation.

Ce travail est divisé en trois chapitres principaux :

- ✓ Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui présente des généralités sur les deux partenaires (légumineuses et rhizobia) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuse)
- ✓ Le deuxième chapitre exprime le matériel et les méthodes utilisées dans cette étude
- ✓ Le troisième chapitre regroupe les principaux résultats et ses interprétations avec leur discussion

En fin une conclusion générale est établie pour ressortir l'apport de notre approche.



Chapitre I
Revue bibliographique

1. L'azote dans la nature

L'azote est un élément essentiel pour toutes les formes de vie découvertes sur notre planète. Par rapport à leur masse de matière sèche, l'azote est le quatrième élément nutritif important des plantes (**Hopkins, 2003**). Il constitue très fréquemment le facteur limitant principal pour la production végétale agricole (**Roger, 1996**). C'est un constituant essentiel des protéines, des acides nucléique, des hormones, des chlorophylles et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes (**Hopkins, 2003**).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Les plantes assimilent l'azote sous forme NO_3^- et NH_4^+ . L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (**Bado, 2002**).

L'atmosphère est constituée d'environ 78% en volume d'azote (N_2), un gaz incolore et inodore (**Hopkins, 2003**), mais en très faible quantité de l'ammoniac (NH_3) et des oxydes d'azote (N_2O , NO_2 , NO) qui sont les produits des fumées industrielles, des feux de forêts, et des activités volcaniques. Les organismes vivants, plantes et animaux peuvent aussi rejeter de faibles quantités de NH_3 dans l'atmosphère. Les nitrates résultent de l'oxydation de N_2 par O_2 ou par l'ozone (O_3) sous l'effet des éclaires et les radiations ultraviolettes. Ils peuvent également provenir des océans et être apporté sur les côtes sous formes d'aérosols (**Morot-Gaudry, 1997**).

Les sols contiennent des réserves importantes en éléments azotés, mais ces derniers ne sont pas en général directement assimilables par les plantes. Par exemple, la couche arable d'un hectare contiendrait de 2 à 10 tonnes d'azote. Cependant une partie seulement de ces réserves est libérée à la suite de l'activité biologique des sols et des processus chimique. L'enlèvement des récoltes diminue les teneurs en éléments libérés. Pour compenser les pertes d'azote du sol, on procède à un apport d'azote sous forme d'engrais minéraux, nitrique, ammoniacal et le plus souvent mixte (100 à 250 kg d'azote par hectare), (**Morot-Gaudry, 1997**).

Les engrais azotés sont appliqués depuis plus de 150 ans. Ils permettent d'attendre des rendements cultureux suffisamment élevés pour théoriquement assurer à faible cout les ressources alimentaires de presque toute l'humanité. Ils sont synthétisés industriellement à partir de l'azote moléculaire de l'air, réduit en ammoniac, en présence de méthane et d'eau. L'ammoniac est oxydé ensuite en acide nitrique. Le mélange nitrate ammonium est un des engrais les plus utilisés en agriculture (**Morot-Gaudry, 1997**).

2. Cycle d'azote

L'azote est généralement reparti dans trois ensembles principaux l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote. Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumis de nouveau l'azote dans la nature. C'est un cycle continu et peut être décomposé en quatre types de réaction où les microorganismes jouent un rôle dans ces derniers.

En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, de nitrification et de dénitrification. Les nitrates assimilés par les plantes et les animaux après la nitrification passe par une décomposition et une ammonification, puis il est de nouveau soumis à une nitrification (Torche, 2006).

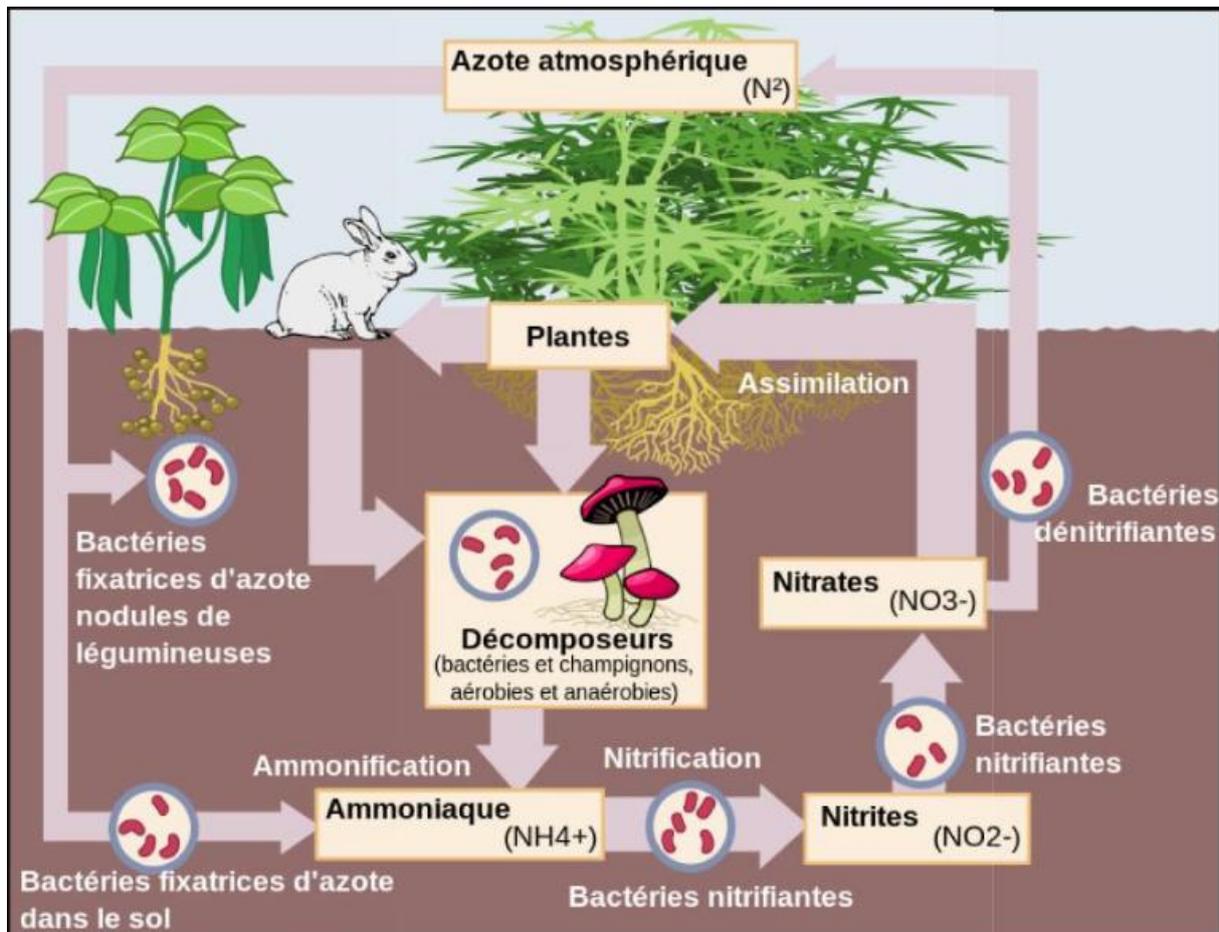


Figure 01 : cycle de l'azote (Pyjic, 2009)

2.1. Fixation de l'azote

Les rares créatures terrestres capables d'absorber directement l'azote atmosphérique sont des bactéries parmi lesquelles, les cyanobactéries. On appelle fixation de l'azote le processus par lequel ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac (réduction du diazote en ammoniac).

2.2. Ammonification

L'ammonification est le processus par lequel les bactéries et les champignons transforment les matières organiques en libérant leurs composants azotés. Plus précisément, c'est le processus par lequel l'azote sous forme organique devient de l'azote ammoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Par son manque de spécificité, ce processus peut avoir lieu dans une large gamme de température, d'humidité et de pH du sol (**Henintsoa, 2013**).

2.3. Nitrification

C'est la production de nitrites (NO_2^-) et de nitrates (NO_3^-) par oxydation des ions ammonium (NH_4^+). Au cours de la première étape de cette réaction, le genre *Nitrosomonas* oxyde les ions ammonium en nitrites. Dans la deuxième étape, des microorganismes dont le genre *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates (**Raven et al., 2007**).

2.4. Dénitrification

Lorsque la teneur en oxygène de l'atmosphère de sol devient insuffisante pour qu'il puisse remplir son rôle d'accepteur d'électrons, les nitrates peuvent être réduits en nitrites par un nombre relativement élevés de microorganismes. Ces nitrites peuvent être par la suite convertis en ammoniac mais si le potentiel d'oxydoréduction continue à baisser, certaines bactéries réduisent les nitrites en oxyde nitreux et en azote moléculaire qui s'échappent vers l'atmosphère extérieure (**Raven et al., 2007**).

3. Fixation biologique de l'azote

C'est le processus de réduction enzymatique du l'azote atmosphérique en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH_3) qui permet de produire des substances azotées, acide aminé et acide nucléiques, à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement sous l'effet de l'activité des microorganismes (**Hopkins, 2003**).

3.1. Fixateurs libres

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

Des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas*;

Des bactéries anaérobies : *Clostridium* (Saoudi, 2008).

3.2. Fixateurs symbiotique

Les plantes supérieures ne fixent pas l'azote atmosphérique. Toutefois un certain nombre entre en symbiose avec des diazotrophes existant encore à la fois dans le sol et à l'état d'organites symbiotiques dans la nodosité (Guignard, 2000).

Les bactéries symbiotiques sont de loin les plus importantes si l'on tient compte des quantités totales d'azote fixé, les plus communes sont *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, qui toutes deux pénètrent dans les racines de légumineuses (Raven et al., 2007).

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. Dans ces processus symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote (Hopkins, 2003).

Les bactéries procurent aux plantes une forme d'azote utilisable pour la synthèse de leurs protéines. De son côté, la plante fournit aux bactéries des éléments carbonés nécessaires à la production de leur propres molécules azotées (Guignard, 2000).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte d'organes spécifiques qui sont les nodosités, à l'intérieur desquelles l'azote moléculaire atmosphérique est réduit en ammoniac, en retour la bactérie utilise les assimilats de la plante hôte comme source d'énergie (Hopkins, 2003 ; François et al., 1997).

Divers types d'associations symbiotiques s'établissent entre des plantes et des micro-organismes telle que l'interaction entre le genre *Azospirillum* et l'herbes : Des espèces du genre *Azospirillum* se développent sur la partie corticale d'herbes tropicales en se nourrissant de composés carbonés produits par la plante. En retour, la bactérie fixe de grandes quantités d'azote utilisées pour la croissance des deux partenaires (Perry et al., 2004).

4. Partenaires de la symbiose fixatrice d'azote

4.1. Partenaires végétal : Les légumineuses

4.1.1. Généralités

Les légumineuses représentent la plus grande famille d'angiosperme et la troisième plus grande famille de plantes à fleurs. Elles sont présentes dans presque tous les milieux terrestres. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales, comprenant des plantes herbacées, des arbres, des arbustes ou des lianes, à feuilles habituellement composées, rarement simples, généralement avec des stipules. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Parfois plus, caractéristiques, ressemblent souvent à des papillons. Fruit en gousse uniloculaire s'ouvrant en deux valves séparées et contenant de nombreuses graines (**Benselama, 2015 ; Ghalem, 2009 ; Mouafek, 2010 ; Sebihi, 2008**).

Cette famille des légumineuses possède 674 genres et plus de 18000 espèces (**Sebihi, 2008**). La plus grande partie des légumineuses (88%) des espèces étudiées interagissent avec les bactéries du genre *Rhizobium* pour former des nodules fixateurs d'azote. De ce fait les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (**Emile et al., 2004 ; Saoudi, 2008**).

4.1.2. Classification

Les légumineuses sont subdivisées en trois sous familles d'importance inégale :

Caesalpinioideae

Cette sous-famille rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Parmi les espèces de *Caesalpinioideae*, seulement 23% ont été décrites comme étant capables d'être nodulées, leurs fleurs irrégulières possèdent 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (**Dhane fitouri, 2011 ; Ghalem, 2009 ; Sebihi, 2008 ; Sousou, 2013**).

Mimosoidea

Ce sont pour la plupart des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces, parmi les 10% d'espèces déjà examinées, à plus de 90% sont nodulées. Leurs fleurs petites, et les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (**Dhane fitouri, 2011 ; Ghalem, 2009 ; Saoudi, 2008 ; Sebihi, 2008 ; Sousou, 2013**).

Papilionideae

Représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces, principalement herbes et petits arbustes distribués dans le monde entier, présentes en régions tempérées et tropicales, parmi les espèces testées 97 % sont nodulées, elles ont des fleurs en forme de papillon avec un pétale supérieur (**Ghalem, 2009 ; Sebihi, 2008 ; Sousou, 2013**).

4.1.3. Intérêts des légumineuses

Intérêt agronomique

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote (**Journet et al., 2001**). Elles ne nécessitent aucune fertilisation azotée et contribuent naturellement à enrichir le sol en azote ce qui permet de réduire les coûts de production et de diminuer les pertes dues à l'érosion (**Cavaillès, 2009**).

Les légumineuses ont la capacité de solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore par leurs exsudats racinaires (**Lazrek, 2008**).

Intérêt environnementale

Les légumineuses, en fournissant habitats et sources de nourriture, favorisent la survie de la faune dont les insectes pollinisateurs (la majorité des légumineuses sont des plantes mellifères). Leur fixation de l'azote permet de réduire sensiblement les émissions de gaz à effets de serre à contrario, la fabrication d'engrais azotés nécessite des quantités importantes de gaz naturel (55% à 65 % du bilan énergétique d'une grande culture provient de l'énergie de fabrication des engrais). (Commissariat général au développement durable, 2010). Par ailleurs, l'épuisement des sols tropicaux, provoqué par une intensification de l'agriculture et de l'élevage, est souvent aggravé par l'érosion. Pour cela, une solution consiste à planter des végétaux fixateurs d'azote. Dans le premier cas, ces végétaux servent d'engrais vert, c'est-à-dire qu'ils sont enfouis dans le sol par labourage avant de mettre en culture les céréales. Pour le deuxième cas, celui de la protection des sols érodés, les végétaux pionniers utilisés pour fixer les dunes mobiles ou les pentes dénudées, en retenant le sol par leur puissant réseau racinaire, ces végétaux peuvent appartenir à la famille des légumineuses. (**Domergue et al., 1985**).

Quelques espèces ne sont pas dénuées de toxicité (comme par exemple les fèves de Calabar, les graines et les fleurs de *Spartiumjunceum*). On peut noter aussi l'usage comme insecticide : la roténone, insecticide naturel obtenu à partir de plantes du genre *Derris*, est le seul utilisable en agriculture biologique. (**Saoudi, 2008**).

Intérêt alimentaire

L'intérêt alimentaire est évident : cette famille représente le 2^{ème} rang mondial (derrière les céréales). On peut citer le soja, les lentilles, les haricots et autres fèves. Les graines des légumineuses contiennent généralement 20 à 30% de protéines et sont particulièrement riche en lysine, un acide aminé essentiel pour la croissance (**Djebali, 2008**).

Les variétés modernes de céréales à haut rendement (riz, sorgho, maïs) obtenues par sélection, sont exigeantes en élément minéraux ; elles épuisent rapidement les sols tropicaux qui sont, bien souvent, très pauvres en azote, en phosphore et en autre élément indispensable à la croissance des végétaux. Les quantités d'engrais azotés et phosphatés nécessaires à une amélioration des rendements sont donc élevées et le coût de ces fertilisants généralement importés des pays développés est incompatible avec les ressources financières de la grande majorité des paysans dans les pays tropicaux ou en voie de développement pour la plus part (**Dommergues et al., 1985**).

4.2. Partenaire bactérien : les rhizobia

Rhizobium ou rhizobia est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les racines des légumineuses et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Récemment ce terme a été substitué par le terme de BNL (Bactéries Nodulant les légumineuses) (**Zakhia et de Lajudie, 2006; Zakhia et al., 2004**).

4.2.1. Caractères morphologiques

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatifs, non sporulants, on distingue deux formes ; la forme végétative et la forme de bactéroïde.

Les rhizobia sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,8 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur pour les rhizobia à croissance rapide. Les rhizobia à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (**Somasegaran et Hoben, 1994**)

À l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (**Perry et al., 2004**). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

4.2.2. Caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Les rhizobia à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure sur le glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Les rhizobia n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (**Pelmont, 1995**).

4.2.3. Caractères physiologiques

Rhizobium est un micro-organisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

4.2.4. Caractères culturaux

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des rhizobia (**Vincent, 1970**). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées enbactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (**Boivin-Masson et al., 2006**)

4.2.5. Caractères moléculaires

Le génome des bactéries est constitué en plus de l'ADN chromosomique, d'ADN plasmidique qui peut constituer jusqu'à 50 % du génome entier (**Squartini et al., 2002**)

4.2.6. Classification

Tableau 01: classification des *rhizobiums* (**Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014**)

Espèce	Plante-hôte
<p>Classe : Alphaproteobacteria Ordre : Rhizobiales</p> <p>Famille : Rhizobiaceae Genre : Rhizobium <i>R. leguminosarum</i></p> <p>biovar <i>viciae</i></p> <p>biovar <i>trifolii</i> biovar <i>phaseoli</i> <i>R. tropici</i> Type II A Type II B <i>R. etli</i></p> <p>biovar <i>phaseoli</i></p> <p>biovar <i>mimosae</i> <i>R. hainanense</i></p> <p><i>R. gallicum</i></p> <p>biovar <i>gallicum</i> biovar <i>phaseoli</i> <i>R. mongolense</i> <i>R. galegae</i> biovar <i>orientalis</i> biovar <i>officinale</i></p> <p><i>R. giardini</i> biovar <i>giardini</i> biovar <i>phaseoli</i></p> <p><i>R. huautlense</i> <i>R. indigoferae</i> <i>R. sullae</i> <i>R. loessense</i> <i>R. yanglingense</i></p> <p><i>R. daejeonense</i> <i>R. cellulolyticum</i></p>	<p><i>Pisum sativum</i>, <i>Vicia</i> <i>Lathyrus</i>, <i>Lens</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> L.</p> <p><i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i> <i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i></p> <p><i>Phaseolus vulgaris</i>, <i>Leucaena</i> <i>Mimosa affinis</i> <i>Desmodium sinuatum</i> et autres plantes de région arides</p> <p><i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Medicago ruthenica</i></p> <p><i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i></p> <p><i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Sesbania herbacea</i> <i>Indigofera</i> <i>Hedysaum coronarium</i> <i>Astragalus</i>, <i>Lespedeza</i> <i>Coronilla</i>, <i>Amphicarpaea</i>, <i>Gueldenstaedtia</i> Bioreactor Nod+ on <i>Medicago sativa</i></p>
<p>Genre : Sinorhizobium</p> <p><i>S. meliloti</i></p> <p>biovar <i>meliloti</i></p> <p>biovar <i>acaciae</i> biovar <i>medicaginis</i> <i>S. fredii</i></p> <p>chemovar <i>fredii</i> chemovar <i>siensis</i> <i>Sinorhizobium xinjiangense</i> <i>S. sahelense</i> biovar <i>acaciae</i> biovar <i>sesbaniae</i> <i>S. terangae</i></p> <p>biovar <i>acaciae</i> biovar <i>sesbaniae</i> <i>S. medicae</i> <i>S. kostiense</i> <i>S. morelense</i> <i>S. americanum</i></p>	<p><i>Medicago</i>, <i>Melilotus</i>, <i>Trigonella</i></p> <p><i>M. lacinata</i>, <i>M. sativae</i></p> <p><i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Sesbania</i> spp <i>Acacia</i> spp <i>Sesbania</i> spp</p> <p><i>Acacia</i> spp <i>Sesbania</i> spp <i>Medicago</i> spp <i>Acacia</i>, <i>Prosopis</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Acacia</i> <i>Acacia</i>, <i>Prosopis</i> <i>Kummerowia stipulacea</i> <i>Sesbania</i>, <i>Medicago</i></p>

<p><i>S. arboris</i> <i>S. Kummerowiae</i> <i>S. adhaerens</i></p> <p>Genre : Allorhisobium <i>A. undicola</i> Famille : Phyllobacteriaceae Genre : Mesorhizobium <i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> biovar<i>loti</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i></p> <p><i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. amorphae</i> <i>M. chacoense</i> <i>M. temperatum</i> <i>M. septentrionale</i> <i>M. thiogangeticum</i> <i>M. albiziae</i> Genre : Phyllobacterium <i>P. trifolii</i></p> <p>Famille : Methylobacteriaceae Genre : Methylobacterium <i>M. nodulans</i></p> <p>Famille : Brucellaceae Genre : Ochrobactrum <i>Ochrobactrum</i> sp. <i>Ochrobactrum lupini</i> Famille : Hyphomicrobiaceae Genre : Azorhizobium <i>A. caulinodans</i> <i>A. johannense</i> <i>Azorhizobium</i> sp.</p> <p>Genre : Devosia <i>Devosianeptuniae</i></p> <p>Famille : Bradyrhizobiaceae Genre : Bradyrhizobium <i>B. japonicum</i> biovar<i>genistearum</i> biovar<i>glycinearum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i> biovar<i>glycinearum</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> biovar<i>genistearum</i> biovar<i>glycinearum</i> <i>Bradyrhizobium</i> sp.</p> <p>Genre : Blastobacter <i>B. denitrificans</i></p> <p>Classe : Beta Proceobacteria Ordre : Burkholderiales Famille : Burkholderiaceae Genre : Burkholderia <i>Burkholderia</i> sp. <i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i></p>	<p>Neptunianatans</p> <p><i>Lotus corniculatus</i> <i>Astragalus sinicus</i>, <i>Acacia</i> spp</p> <p><i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> et autres plantes tropicales <i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia</i>, <i>Prosopis</i> <i>Amorpha fruticosa</i> <i>Prosopis alba</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Astragalus adsurgens</i> soil (India, Clitoria ternatea) <i>Albizia kalkora</i></p> <p><i>Trifolium pratense</i></p> <p><i>Crotalaria</i> spp</p> <p><i>Acacia mangium</i> <i>Lupinus albus</i></p> <p><i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgata</i> <i>Sesbania rostrata</i></p> <p>Neptunianatans</p> <p><i>Glycine max.</i> <i>Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i>, <i>Glycine soja</i></p> <p><i>Lespedeza</i> spp <i>Bata vulgaris</i></p> <p><i>Genistea</i> et <i>Lotea</i></p> <p><i>Vigna</i>, <i>Lupinus</i>, <i>Mimosa</i>, <i>Acacia</i>, <i>Aeschynomene</i></p> <p><i>Aeschynomene</i></p> <p><i>Machaerium lunatum</i>, <i>Aspalatus</i> <i>Alysicarpus glumaceus</i> <i>Aspalatus carnosus</i> <i>Aspalatus carnosus</i></p> <p><i>Mimosa</i> spp</p>
--	---

<p>Genre : <i>Wautersia</i>(<i>Ralstonia</i>) <i>W. taiwanensis</i></p> <p>Genre : <i>Herbaspirillum</i> <i>H. lusitanum</i></p> <p>Classe : Gamma-Proteobacteria Ordre : Enterobacteriales</p> <p><i>Pantoeaagglomerans</i> <i>EnterobacterKobei</i> <i>Enterobactercloacae</i> <i>Leclerciaadecarboxylata</i> <i>Escherichia vulneris</i></p> <p>Ordre : Pseudomonadales <i>Pseuomonas</i><i>sp</i></p>	<p><i>Phaseolusvulagris</i></p> <p><i>Hedysarumcarnosum</i>, <i>H. Spinosissimum</i>, <i>H. Pallidum</i>,</p> <p><i>Hedysarumcarnosum</i>, <i>H. spinosissimum</i>, <i>H. pallidum</i></p>
--	--

5. Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique

Les interactions entre les légumineuses et les rhizobia se produisent dans la rhizosphère suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine. Beaucoup des substances organiques libérées par les racines ont un faible poids moléculaire et sont donc facilement décomposables par les micro-organismes. Cela conduit à l'existence d'une grande population microbienne autour de la racine. D'autres composés trouvés dans les exsudats racinaires exercent des pressions sélectives sur la communauté microbienne (**El-Hillali, 2006**).

La reconnaissance entre les deux symbiotes est rendue possible par des échanges de signaux moléculaires. Ainsi des composés de types flavonoïdes sont exsudés par les racines de la plante et vont induire la transcription des gènes de la nodulation (les gènes nod), d'autres composés saccharidiques (les polysaccharides extracellulaires) produits par les rhizobia sont essentiels pour l'établissement d'une fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses (**Chataigné, 2007**).

La spécificité *Rhizobium*-hôte est probablement déterminée lorsque les rhizobia s'attachent aux poils absorbants ; elle doit nécessiter une sorte de reconnaissance entre la symbiote et l'hôte. Généralement la reconnaissance entre cellules met en jeu des liaisons chimiques qui s'établissent entre des molécules particulières à la surface de ces cellules. Dans le cas des interactions *Rhizobium*-hôte, la reconnaissance semble mettre en jeu deux classes de molécules : les lectines et des polysaccharides complexes. Les lectines sont des petites protéines sans activité enzymatique qui sont synthétisées par l'hôte et qui présentent à des glucides complexe (**Hopkins., 2003**).

6. Nodulation

Les légumineuses forment une endosymbiose avec des bactéries fixatrices d'azote appelées rhizobia dans un processus de développement soigneusement orchestré appelé nodulation (Guan et al., 2013).

La grande majorité des études sur la symbiose légumineuses-*Rhizobium* se sont concentrées sur le développement du nodule et l'initiation de la fixation de l'azote par les bactéroïdes (Fujishige et al., 2006). La nodulation est considérée comme la première caractéristique de ces associations qui sont strictement contrôlées par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Dhane Fitouri, 2011 ; Khan et al., 2010).

Lorsque la nodulation a lieu, le nombre de nodosités mis en place au sein du système racinaire de la légumineuse est proportionnel aux besoins en azote de la plante pour sa croissance (Voisin, 2015).

Le nodule de légumineuses est le résultat d'interactions fort complexes entre le partenaire bactérie (*Rhizobium*) et la racine à laquelle il s'est spécifiquement associé. Dans le nodule, le *Rhizobium* augmente de dimension, change de forme pour devenir un bactéroïde (Bounaama, 2014). Dans tous les cas, le nodule comporte en allant de l'extérieur vers l'intérieur l'épiderme et le cortex externe, le parenchyme nodulaire (appelé antérieurement cortex interne), qui renferme les tissus vasculaires et la zone centrale infectée, qui est le siège de la fixation de la N₂ (Bounaama, 2014).

Sur la base de leur morphologie, leur structure et la durée du fonctionnement du méristème nodulaire, les nodules des légumineuses se subdivisent en deux catégories : les nodules déterminés et les nodules indéterminés (Lebida, 2009). Les nodules de type indéterminé sont formés par les légumineuses issues de milieux tempérés comme la luzerne, le pois ou le trèfle. Ces nodules se développent à partir des cellules du cortex interne (Vernié, 2008). Il a un méristème apical persistant et adopte une forme cylindrique (Coba et al., 2018). Les nodules de type déterminé sont formés par des légumineuses d'origine tropicale comme le soja ou le haricot. Ces nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe et sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant (Vernié, 2008). Il a un méristème latéral qui reste actif pendant quelques jours. Après l'arrêt de l'activité méristématique, le nodule se développe par expansion cellulaire et adopte une forme sphérique (Coba et al., 2018).

6.1. Génétique de la nodulation chez les bactéries

Un certain nombre de gènes bactériens indiqués *nod* et *nol* est exigé pour la nodulation. Ces gènes sont localisés sur un grand plasmide appelé plasmide Sym, mais de tels gènes sont situés sur le chromosome de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*. Plusieurs groupes de gènes de microsymbionte contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote (**Sharma et al., 1993**).

6.1.1. Gènes *nod*

Trois ensembles de gènes semblent négocier les premières étapes de la nodulation :

Les gènes *nod* communs

Les gènes *nodABCJI* sont présents chez tous les rhizobia étudiés jusqu'ici et les mutations dans ces gènes mènent à un phénotype Nod^- . Ces gènes codent pour les étapes conservées évolutives essentielles pour le processus de nodulation (**Sharma et al., 1993**). Ces gènes sont situés sur un opéron duquel *nodABC* sont essentiels pour la nodulation. Ces derniers sont fonctionnellement interchangeables entre les espèces et nécessaires notamment pour induire le curling et inciter les cellules végétales à se diviser (**Brewin et al., 1992 ; Pelmont, 1995**).

Les gènes *hsn*

Host specific nodulation sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (**Pelmont, 1995**). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (**Sharma et al., 1993**). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (**Davet, 1996**).

Les gènes *nod D*

Gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoïdes (**Pelmont, 1995 ; Sharma et al., 1993**).

6.1.2. Gènes *nif*

La synthèse de la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (**Hopkins, 2003**). Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase ; *nifH*, *nifD*, *nifK* dont *nifH* code pour la réductase et *nifD* et *nifK* pour les

polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (**Pelmont, 1995**). Aussi les gènes par exemple, *nifB*, *nifE* sont impliqués dans la synthèse du cofacteur FeMo qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (**Brewin et al., 1992**).

6.1.3. Gènes *fix*

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

6.1.4. Autres gènes

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

6.2. Génétique de la nodulation chez la plante

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes d'un certain nombre de protéines nommées nodulines en réponse des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. Ces protéines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome des cellules hôtes (**Hopkins, 2003**). Certaines nodulines sont des enzymes du métabolisme azoté (glutamine synthétase, GOGAT) ou carboné (saccharose synthase, PEP carboxylase). La plus spectaculaire est une protéine qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la légghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, et ce dispositif est indispensable à la fixation de l'azote (**Pelmont, 1995**).

6.3. Substances responsables de la nodulation

6.3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés excrétés des plantes, les plus importants de la perspective symbiotique (**Perret et al., 2000**). Ces substances phénoliques sont les facteurs les plus subtils qui aident les associés à s'associer (**Broughton et al., 2000**).

Les flavonoïdes, qui incluent des isoflavones, des chalcones, des flavonols, des flavones, et des anthocyanidines et autres composés relatifs induisent des gènes pour la nodulation (**Terefework, 2002**), déclenchent spécifiquement leur expression (**Perret et al., 2000**), et interagissent avec les protéines NodD qui servent comme sondes environnementales et activateurs de transcription (**Broughton et al., 2000**). Parfois, les flavonoïdes sont catabolisés et leur dégradation pourrait mener à l'apparition de quelques composés qui peuvent être des

inducteurs plus efficaces des gènes *nod* qu'eux même (**Broughton et al., 2000**). Bien que des petites quantités sont excrétés sans interruption, les concentrations des flavonoïdes dans la rhizosphère augmentent en réponse du rhizobia compatibles (**Broughton et al., 2000**).

Habituellement, les rhizobia les plus promiscues sont induits par un grand nombre de flavonoïdes et de composés relatifs (**Terefework, 2002**). La capacité induisante change avec les flavonoïdes et les rhizobia et dans certains cas de flavonoïdes telles que le chrysin peuvent contrarier l'induction des gènes *nod* (**Perret et al., 2000 ; Terefework, 2002**). En plus à l'induction des gènes *nod*, les flavonoïdes semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante (**Terefework, 2002**), et leur production est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (**Broughton et al., 2000**).

6.3.2. Facteurs Nod

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod sont des molécules lipochitoooligosaccharidiques (**Terefework, 2002**). Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (**Debellé et al., 2001**).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nodABCD* codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* pour les diverses substitutions des facteurs Nod (**Broughton et al., 2000**).

La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (**Terefework, 2002**)

6.3.3. Autres substances

D'autres produits semblent être nécessaires pour le développement continu du fil d'infection et de l'organogenèse du nodule, et ceux-ci représentent un troisième ensemble de signaux. Parmi ce dernier, les polysaccharides extracellulaires (EPS), les lipopolysaccharides, les antigènes K, les glucanes cycliques, les lectines et les protéines exportés par le système de sécrétion de type trois (TTSS) (**Broughton et al., 2000; Terefework, 2002**).

6.4. Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par des signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan et al., 2007).

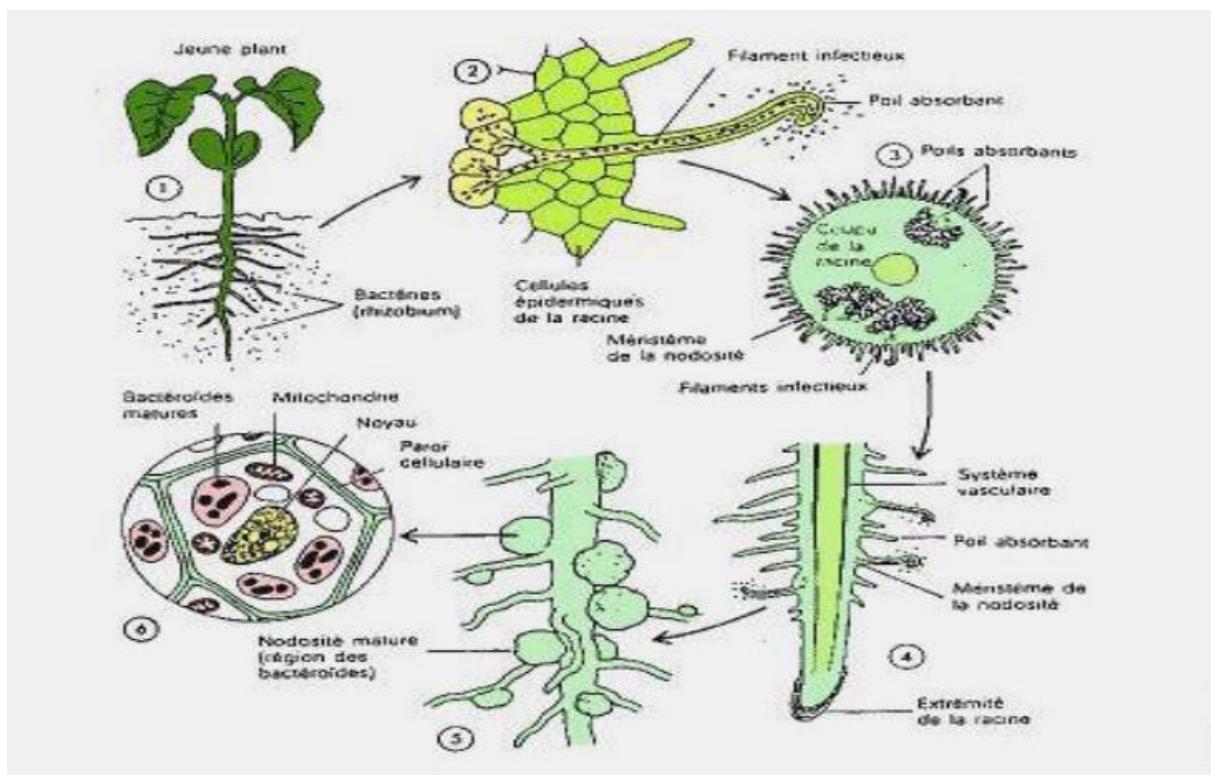


Figure 02: Schéma général de la symbiose (Sebihi, 2008).

6.4.1. Pré échange de signal

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En présence des racines de l'hôte, la multiplication des bactéries et la colonisation de la rhizosphère sont accrues. L'attraction des bactéries par les racines des plantes hôtes semble d'abord impliquer un chimiotactisme positif (Hopkins, 2003). Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes *nod* chez les rhizobia (Waligora et al., 2008).

Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitinoooligosaccharides) (Dénarié, 2000). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca et al., 2004). Les rhizobia diffèrent dans la structure de leurs facteurs de

nodulation constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité de l'hôte (**Moschetii et al., 2005**).

6.4.2. L'infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (**Perry et al., 2004**). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérélique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (**Dupuy et Nougier, 2005**). *Rhizobium* s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (**Bélangier, 1998**). Cette interaction induit une déformation du poil absorbant à 360° appelée «crosse de berger ». Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (**Machrafi, 2001**). En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (**Dupuy et Nougier, 2005**).

Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (**Perry et al., 2004**). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance) (**Pelmont, 2005**).

6.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe contenant des mucilages limités par des fibrilles cellulosiques d'origine végétale ; c'est le filament d'infection (**Dupuy et Nougier, 2005**). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (**Bélangier, 1998**). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes ; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (**Dupuy et Nougier, 2005**). La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des *rhizobia* à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des *rhizobia* en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (**Machrafi, 2001**).

Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *al.*, 2004).

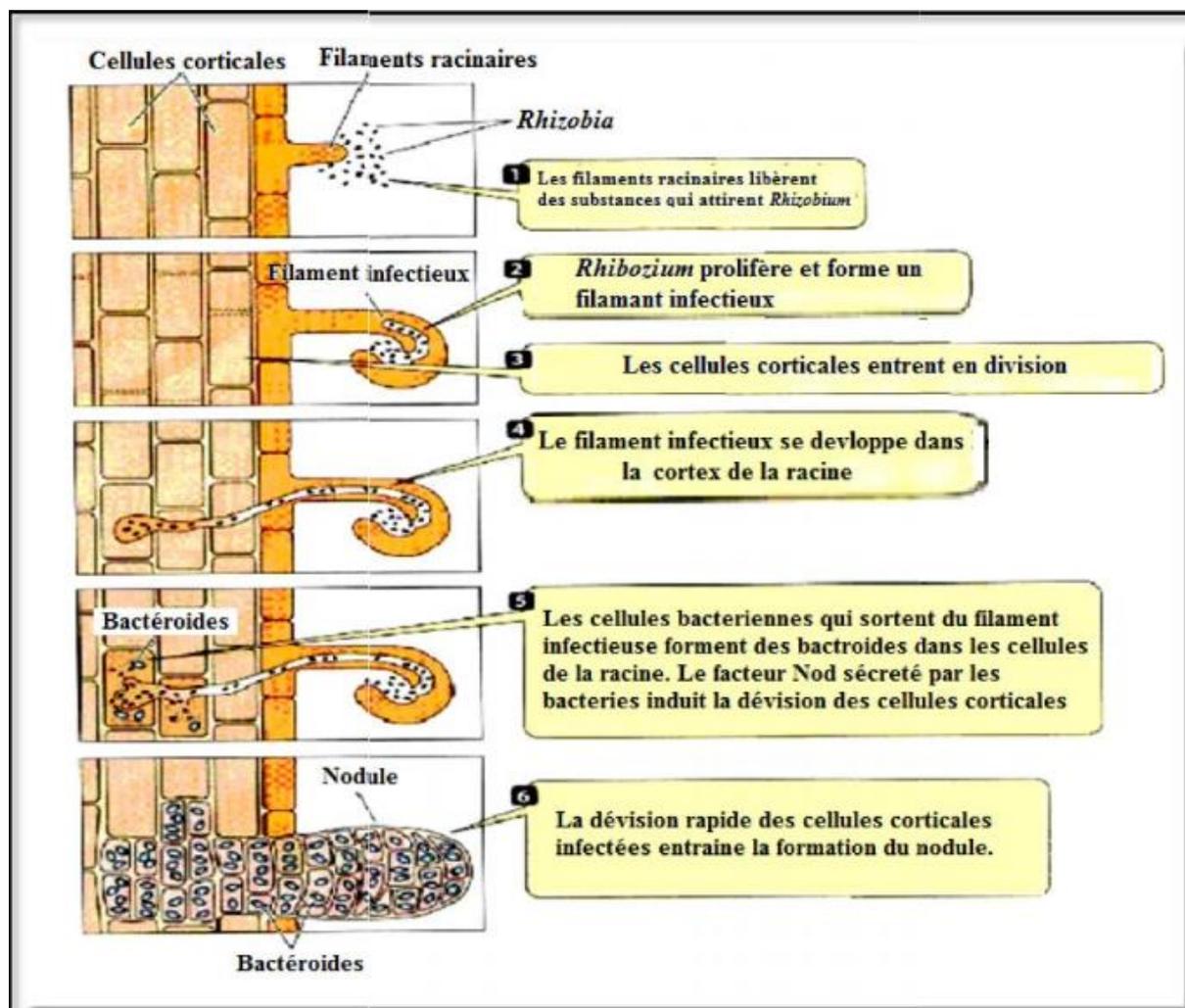


Figure 03 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004)

7. Effet des facteurs abiotique sur la symbiose

La survie des rhizobia dans le sol, la formation des nodosités et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensible à l'action directe d'un certain nombre de facteurs de l'environnement (Guy, 1987). En effet, plusieurs facteurs tels que la composition physico-chimique du sol peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice de l'azote après symbiose (Collavino *et al.*, 2005; Kinkema *et al.*, 2006).

7.1.Effet du pH

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994).

L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobies et engendre par conséquent une diminution de la nodulation. Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le *Rhizobium* que pour la plante hôte (Dhane Fitouri, 2011).

7.2.Effet de la température

La température a un effet sur la symbiose et intervient dans le processus d'infection des poils racinaires, la différenciation de la bactérie au sein du nodule, la structure et le fonctionnement nodulaire. Elle peut également avoir un impact sur la persistance des rhizobies dans l'inoculum durant son stockage, leur survie dans le sol ainsi que sur la nodulation et la fixation d'azote (Graham, 1992).

La plupart des rhizobies se développent entre 28 et 31°C et sont généralement incapables de se multiplier à 37°C et en dessous de 10°C. Des souches de rhizobies capables de s'adapter à de fortes températures pouvant atteindre 45°C ont été décrites, ces souches sont devenues non infectives par perte de leurs plasmides symbiotiques (El hillali, 2006).

Une température élevée des sols pourrait donc contribuer à la présence de souches non infectives dans les sols (Segovia et al., 1991), ainsi induire un retard de la nodulation ou limiter celle-ci à la partie profonde du sol, où les températures sont moindres (Domergue, 2006).

7.3.Effet du NaCl

La tolérance des rhizobies à la salinité est plus ou moins importante ; certaines souches sont inhibées en culture pure à des concentrations en sel de 100 mM alors que d'autres tolèrent des concentrations supérieures à 400 mM (Domergue, 2006). Mais généralement il est admis que la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote, au moins en partie, en limitant le fonctionnement des nodosités par une baisse de leur conductance à la diffusion de l'oxygène. En plus, dans les régions arides et semi-arides, la salinité est un facteur majeur de la détérioration du sol et le rend impropre pour l'agriculture (Saadallah et al., 2001).

Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont très perturbés par le stress osmotique qui affecte à la fois les populations rhizobiennes, la plante hôte et la relation symbiotique. L'initiation nodulaire est extrêmement sensible à la contrainte osmotique en raison de la réduction des sites d'infection de la racine, du nombre de poils racinaires et de la proportion de ceux qui portent les cordons d'infection (L'Taief, 2009).

8. Mécanismes d'adaptation au stress salin

8.1. Chez les bactéries

Une augmentation de la concentration en sel dans le milieu externe entraîne un arrêt de croissance des bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, la réponse initiale à une augmentation de la pression osmotique du milieu environnant est une accumulation d'ions K^+ dans le cytoplasme via des transporteurs à faible et haute affinité pour le potassium. Afin de maintenir l'électroneutralité du milieu intracellulaire, cette accumulation s'accompagne d'une synthèse de novo de glutamate. Glutamate de potassium est ensuite progressivement remplacé par des composés plus compatibles avec les processus physiologiques de la cellule, le principal étant la glycine bêtaïne. Certaines bactéries sont capables de synthétiser cette molécule, soit par méthylation de la glycine, soit par oxydation de la choline. Cependant, la plupart possèdent et utilisent des systèmes de transport qui permettent une importation rapide et en masse de ce composé depuis le milieu environnant (Romeo et al., 2001).

8.2. Chez les plantes

La tolérance de la salinité est l'habilité des plantes à croître et compléter leur cycle de vie sur un substrat contenant une forte concentration de sel soluble. Les plantes développent un nombre important de mécanismes biochimiques et cellulaires pour faire face au stress salin.

Pour les mécanismes cellulaires, deux grandes stratégies de résistance au sel étaient connues chez les plantes. Limiter l'entrée de sodium au niveau des racines ou séquestrer le sodium au niveau des feuilles. La première stratégie consiste à évacuer du cytoplasme les ions Na^+ en excès vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur à l'encontre des processus enzymatiques (Flowers et al., 1977). L'autre stratégie permettant aux plantes de survivre en conditions de stress salin consiste à exclure le sodium du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Dans ce cas, les plantes limitent l'entrée des éléments salins et les rejettent dans le compartiment apoplasmique (Munns 2005).

Pour adapter l'équilibre ionique dans la vacuole, le cytoplasme accumule des composés de petite masse moléculaire nommés solutés parce que le point commun chez ces derniers est que ces composés peuvent être accumulés à des taux élevés sans perturber la biochimie intracellulaire (Zhifang et Loescher, 2003 ; Bohert et Jensen, 1996). Ces solutés compatibles comprennent principalement : la proline, la glycine bêtaïne, des sucres et dérivés, des enzymes antioxydantes, des hormones végétales et des polyphénols.



Chapitre II
Matériel et méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de la plante légumineuse du genre *Lotus* situées dans la région d'Ain M'lila, wilaya d'Oum Elbouaghi (36° 02' 00''N, 6° 35' 00''E) Est Algérien.

La récolte est effectuée au printemps, selon la méthode de Vincent (1970) et de Beck et ces collaborateurs (1993). On creuse environ à 15 cm autour de la plante et à 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil radicalaire. On essaye de ne pas endommager les nodules. Au laboratoire, on détache les nodules, puis on les rince et les sèche.

La conservation des nodules se fait au réfrigérateur, pour un usage immédiat, et par dessiccation sous CaCl_2 pour une longue durée de stockage.

NB : les étapes de la collecte et la conservation des nodules sont réalisées par Dr TORCHE.

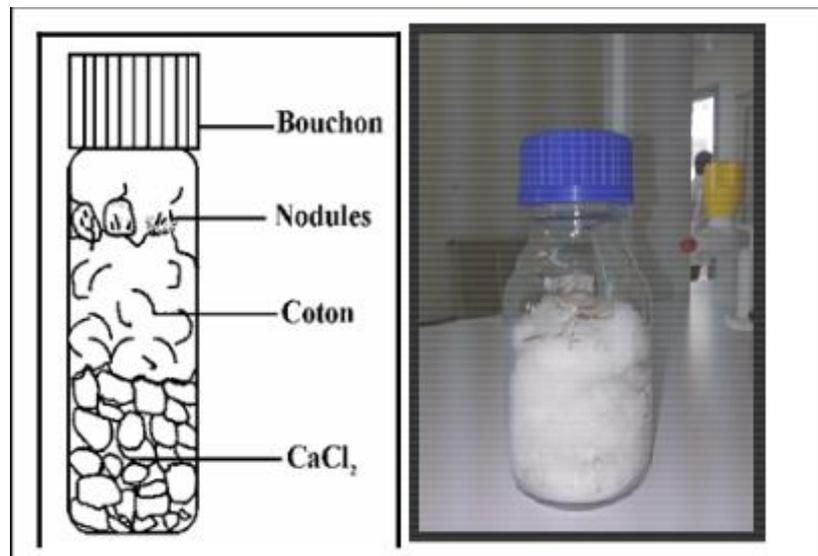


Figure 04 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970)

1.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodules conservés précédemment dans CaCl_2 sont placés dans l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C , puis 1 heure à une température ambiante.

1.2.1. Stérilisation des nodules

Sous la hotte, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié 1% pendant 3 min, ensuite rincés dans l'eau distillé stérile 10 fois, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant une heure après le dernier rinçage.

1.2.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Devant le bec bunsen, chaque nodule stérilisé est écrasé dans une goutte d'eau distillée stérile à l'aide d'une pince stérile. Le jus nodulaire obtenu est étalé par une anse de platine sur la surface des deux milieux spécifiques suivant :

- Yeast-Mannitol-Agar additionné de rouge Congo (YMA-RC).
- Glucose peptone agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA-BCP)

L'ensemencement est réalisé selon la méthode des quatre cadrans et les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

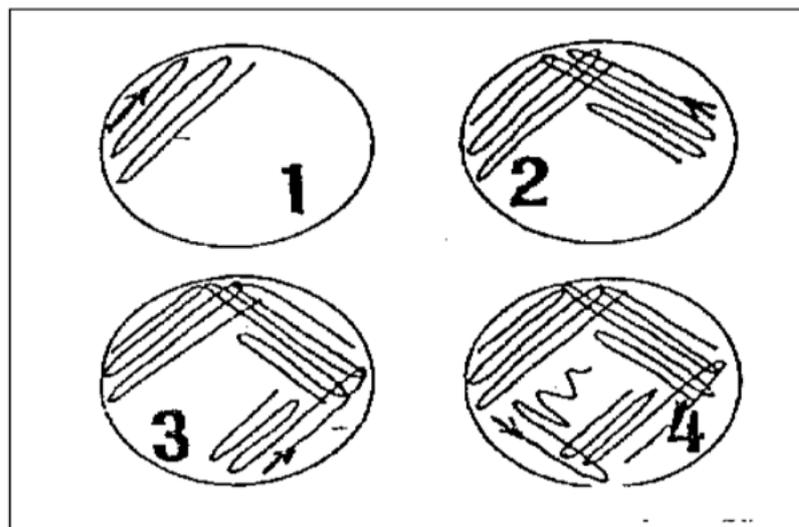


Figure 05 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

2. Etude morphologique des isolats

2.1. Caractères cultureux

Pour faire l'identification, les souches sont ensemencées sur les milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar), YMA+RC (Yeast Mannitol Agar +Rouge Congo), YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar+Bleu de Bromothymol) et le milieu GPA+BCP (Glucose Peptone Agar + Bromocrésol Pourpre). Et sur le milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth). Les isolats sont incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures (**Annexe 1**).

2.2. Examen microscopique par coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.

A partir d'une culture YMB de chaque souche, la préparation d'un frottis est étalée en une couche mince sur une lame séchée et fixée.

Le protocole expérimental consiste à :

- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane, laisser agir une minute.
- Verser le lugol et laisser agir 30 secondes.
- Ajouter goutte à goutte l'alcool.
- Rincer avec de l'eau distillée.
- Recolorer la lame avec de la fuschine, laisser une minute.
- Rincer avec de l'eau distillée et sécher la lame avec du papier absorbant.
- Observer à immersion en utilisant le microscope optique.

Après isolement et purification des isolats (étude morphologique et microscopique), nous avons sélectionné huit souches pour l'étude de l'effet des facteurs abiotiques. Cette dernière est réalisée en présence des souches de référence de rhizobia (**tableau 2**).

Tableau 02 : souches utilisées dans notre étude

Souches	Nom	Plante- hôte	Origine géographique	Source
S ₁	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₂	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₃	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₄	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₅	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₆	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₇	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S ₈	Isolat	<i>Lotus</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
Les soches de référence				
SAM	<i>Rhizobium Leguminosarum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S.dakkiche Constantine
RHF	<i>R. sullae RHF</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Pise, Italie	S.Casella- Pise
A ₆	<i>Rhizobium sullae sp nov.</i> RHA ₆	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar Constantine

3. Conservation des souches

La méthode réalisée est la conservation sur YMA additionné de 3 g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 30 °C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4 °C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

4. Effet des facteurs abiotiques sur les souches bactériennes

4.1. Température

Pour voir l'effet de la température, les souches sont ensemencées sur la surface du milieu YMA à différentes valeurs de températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C, et 50°C. La lecture des boîtes est effectuée après 24 à 48 heures. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

4.2. Effet du pH

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH : 4, 5, 6,7, 8, 9,10. Tous les tubes sont incubés à 28°C avec agitation, et la lecture est effectuée après 24 et 48 heures d'incubation. L'évaluation de la croissance à différentes valeurs du pH est réalisée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

4.3. Effet du NaCl

Les souches sont ensemencées sur le milieu LAS (lactate-aspartate de sodium) (Gloux et Le Rudelier, 1989) avec différentes concentrations de NaCl : 0.01%, 0. 1%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%. Les tubes sont incubés à 28°C avec agitation, et la lecture est effectuée après 24 et 48 heures d'incubation.

- mesurer la Densité optique à 600 nm.

5. Effet du NaCl sur la nodulation

Pour voir l'effet du NaCl sur la nodulation, nous avons fait un test de nodulation ou la solution nutritive est préparée avec différentes concentrations de NaCl.

5.1. Stérilisation des graines

Les graines de *Lotus* placées dans des tubes stériles, sont stérilisées à l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis à l'acide sulfurique concentré pendant 3 min et enfin rincées 10 fois à l'eau distillée stérile. On les laisse gonfler pendant 2 heures après le dernier rinçage.

5.2. Germination des graines

Après stérilisation des graines, elles sont mises en germination sur les boîtes TYA (Bringer., 1974) à l'obscurité total (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 3 à 7 jours, jusqu'à l'apparition des radicelles (**Fig06**).

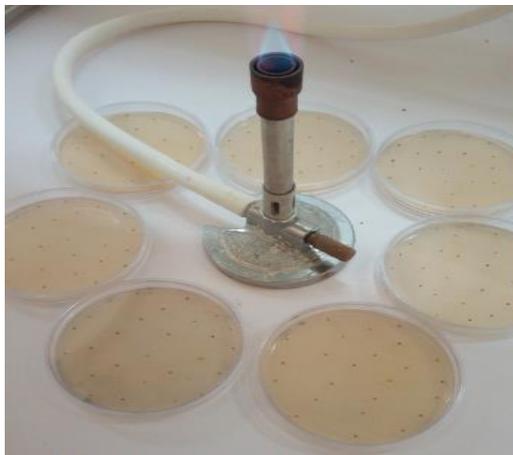


Figure 06 : germination des graines sur milieu TYA.

5.3. Préparation des plantules et inoculation

Après germination des graines, les jeunes plantules sont transférées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu Fahraeus solidifié avec différentes concentrations de NaCl allant de 0,1% jusqu'à 10%. Chaque tube contenant une plantule est inoculé par 1ml des souches isolées.

Les tubes sont maintenus dans les conditions ambiantes du laboratoire durant toute la période du test de nodulation. Après 4 semaines, les plantes sont récoltées pour évaluer la nodulation (**Benhamed, 2010**).



Figure 07 : dispositif utilisé pour le test de nodulation



Chapitre III
Résultats et discussion

1. Etude morphologique des isolats

1.1. Caractères cultureux

Les caractères cultureux des isolats montrent qu'ils ont bien poussé sur le milieu solide YMA, avec une surface lisse, consistance crémeuse et visqueuse, texture homogène et translucide, de couleur blanchâtre ou crème (**fig 08**).



Figure 08 : Croissance des souches sur le milieu YMA

Sur le milieu YMA-Rouge Congo ; la plupart des isolats absorbent le rouge Congo mais on trouve celles qui ne l'absorbent pas et gardent leur couleur blanchâtre. Howieson et Dilworth (2016) ont mentionné que certaines bactéries nodulaires telles que *Sinorhizobium* absorbent le Rouge Congo (**fig 09**).

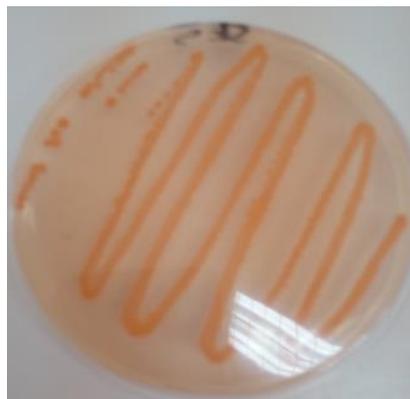


Figure 09 : Croissance des souches sur le milieu YMA-RC

Sur le milieu GPA–BCP, les souches provoquent une modification du pH avec un changement de couleur du milieu du violet vers le jaune. Par contre, la croissance des souches isolées par Benahmed (2010) et Torche (2006) ne modifie pas le pH du milieu et ne provoquent pas une réaction acide du milieu (**fig 10**).



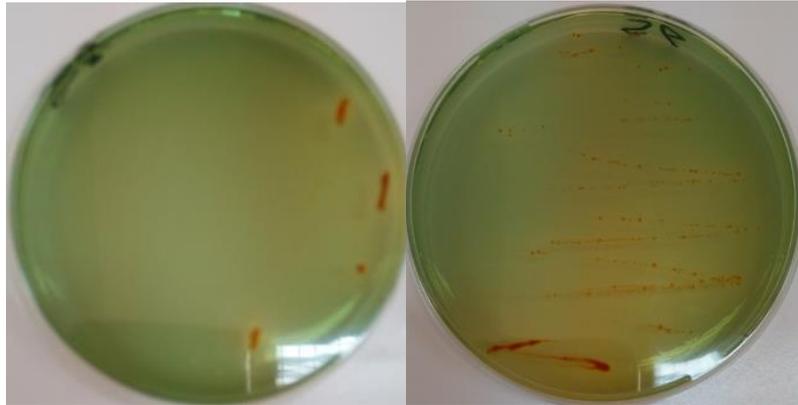
Figure 10 : Croissance des souches sur GPA+BCP

Pour les cultures sur le milieu YMA-BTB, A l'exception de la souche isolée S4 qui a une bonne croissance après 48h (**fig 11a**), la plupart des isolats ont une faible croissance avec un petit virage de couleur du milieu du vert vers le jaune avec acidification du milieu après 48h (**fig 11b**).

Le changement de couleur est une caractéristique des bactéries à croissance rapide (**Jordan, 1984**).



(a)



(b)

Figure 11 : Croissance des souches sur le milieu YMA+BTB

1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram

L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (fig 12).



Figure 12 : Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100)

2. Effet des facteurs abiotiques sur les souches bactériennes

2.1. Température

Nos isolats et les souches de références sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 50°C avec une bonne croissance dans la température 37°C et 45°C.

Concernant la température 4°C les souches sont capables de pousser ; Aussi elles peuvent résister la température 50°C. Ce qu'indique que nos isolats sont Thermophiles (tableau 03).

Les souches rhizobiales isolées par Wei et *al.* (2003) peuvent également croître à 4°C et celles isolées par Diouf et *al.* (2000) résistent des températures très élevée de 40°C à 44°C. Razaneen et *al.* (2002) déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries de survivre dans des périodes chaudes.

Tableau 03 : effet de la température sur la croissance des bactéries

Souches	4°C		20°C		28°C		30°C		37°C		45°C		50°C	
	10j	24H	48H											
S1	+(3j)	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	
S2	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+	+	
S3	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
S4	+(6j)	+	++	+	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	++	
S5	+	+	++	+	++	+	++	++	++	+	+	++	++	
S6	+(3j)	+	+	+	++	+	++	++	+++	+	+	++	++	
S7	+	+	+	+	++	+	+	++	+++	+	+	++	++	
S8	+	+	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	
A6	+ ++(7j) +++ (8j)	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	
SAM	+	+	++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	
RHF	+ ++(7j)	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	

+ : faible croissance ; ++ : moyenne croissance ; +++ : bonne croissance

2.2. Effet du pH

Les souches testées ont la capacité de croître dans l'intervalle de pH 4 à pH 10. D'après les résultats après 24h, l'optimum de croissance de la plupart des souches étudiées est observé à pH 8. La souche S5 présente une croissance optimale à pH 6. Alors que les souches de référence présentent un optimum de croissance à pH=7 (**fig 13**). D'après les résultats après 48h, l'optimum de croissance de toutes les souches étudiées est observé dans l'intervalle de pH 6 à pH 10. Alors que les souches de référence A6 et RHF présentent un optimum de croissance à pH=8 contrairement la souche SAM à pH=7 (**fig 14**). Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Torche (2006) qui ont montré que la majorité de ses souches ont la capacité de pousser dans l'intervalle de pH 4 à 10. Les résultats de Hatimi et *al.* (2001) ont montré que toutes les souches testées sont capables de croître des pH supérieurs à 4,5. Cependant, seules les souches à croissance lente tolèrent le pH 4. Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de la croissance des *Rhizobiums* est entre 6 et 7.

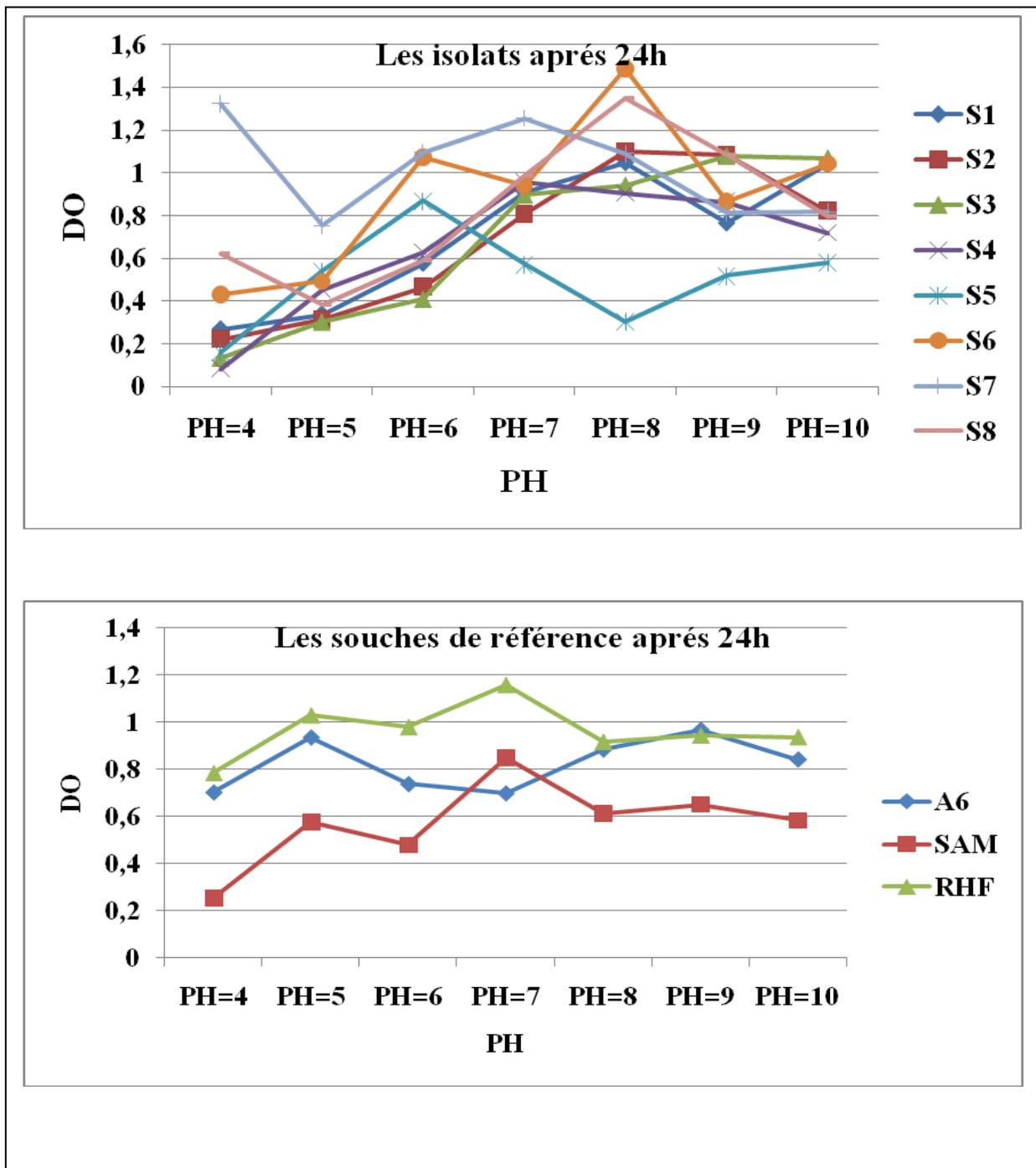


Figure 13 : Effet de pH sur les souches étudiées après 24h

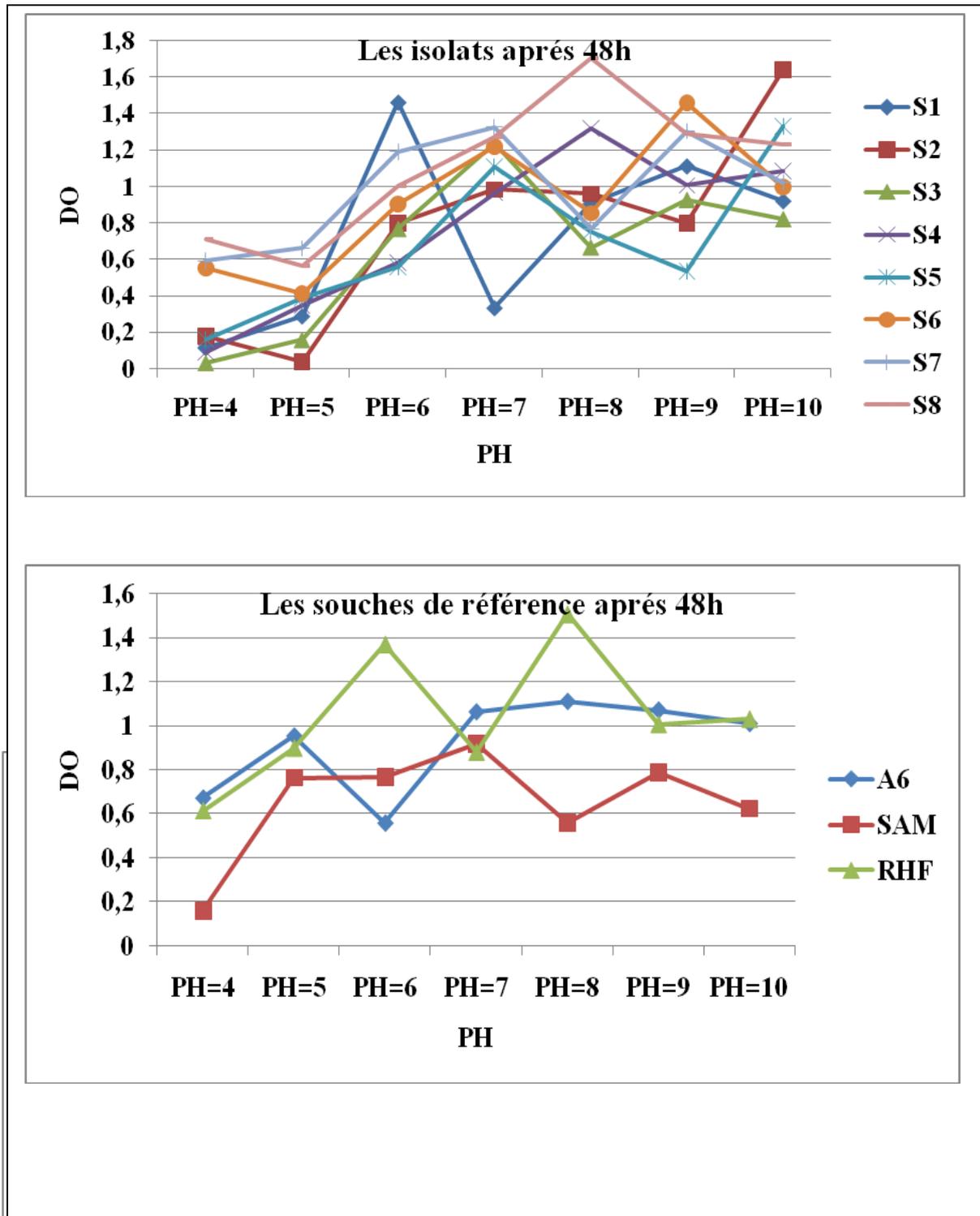


Figure 14 : Effet de pH sur les souches étudiées après 48h

2.3. Effet du NaCl

Les résultats de l'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des souches isolées et les souches de référence (**fig 15, 16**), montrent une grande variabilité dans leur tolérance.

Après 24h la majorité des souches croissent en présence des concentrations de NaCl variant de 0,01% à 10%. A une concentration 0,1% la croissance des souches isolées est optimale contrairement les souches de référence qui donne un optimum de croissance à 0,01%.

Après 48h les souches S6, S7, S8 et les souches de référence présentent une croissance optimale dans la concentration de NaCl de 0,01%. Alors que les souches S1, S5 à 10%; la souche S3 à 5% et S4 à 3% à l'exception de la souche S2 qui a une bonne croissance à la concentration 0,1% et 3%.

D'après les résultats obtenus par Zahran (2001) et Zahran et *al.* (1985), les souches tolérantes et sensibles ont des évolutions respectives rapide et plus lente.

Batzli et *al.* (1992), déclarent que la tolérance au NaCl donne l'évidence de la diversité entre les isolats. Ainsi Wei et *al.* (2003) ont trouvé que les espèces de *Rhizobium loessense* isolées à partir des plantes légumineuses du trèfle et d'astragale n'ont pas pu croître dans un milieu de culture avec 5% de NaCl, tandis que les isolats de *Bradyrhizobium* ont pu tolérer cette concentration et leur croissance est inhibée à une concentration de 8% de NaCl (**Raza et *al.*, 2001**).

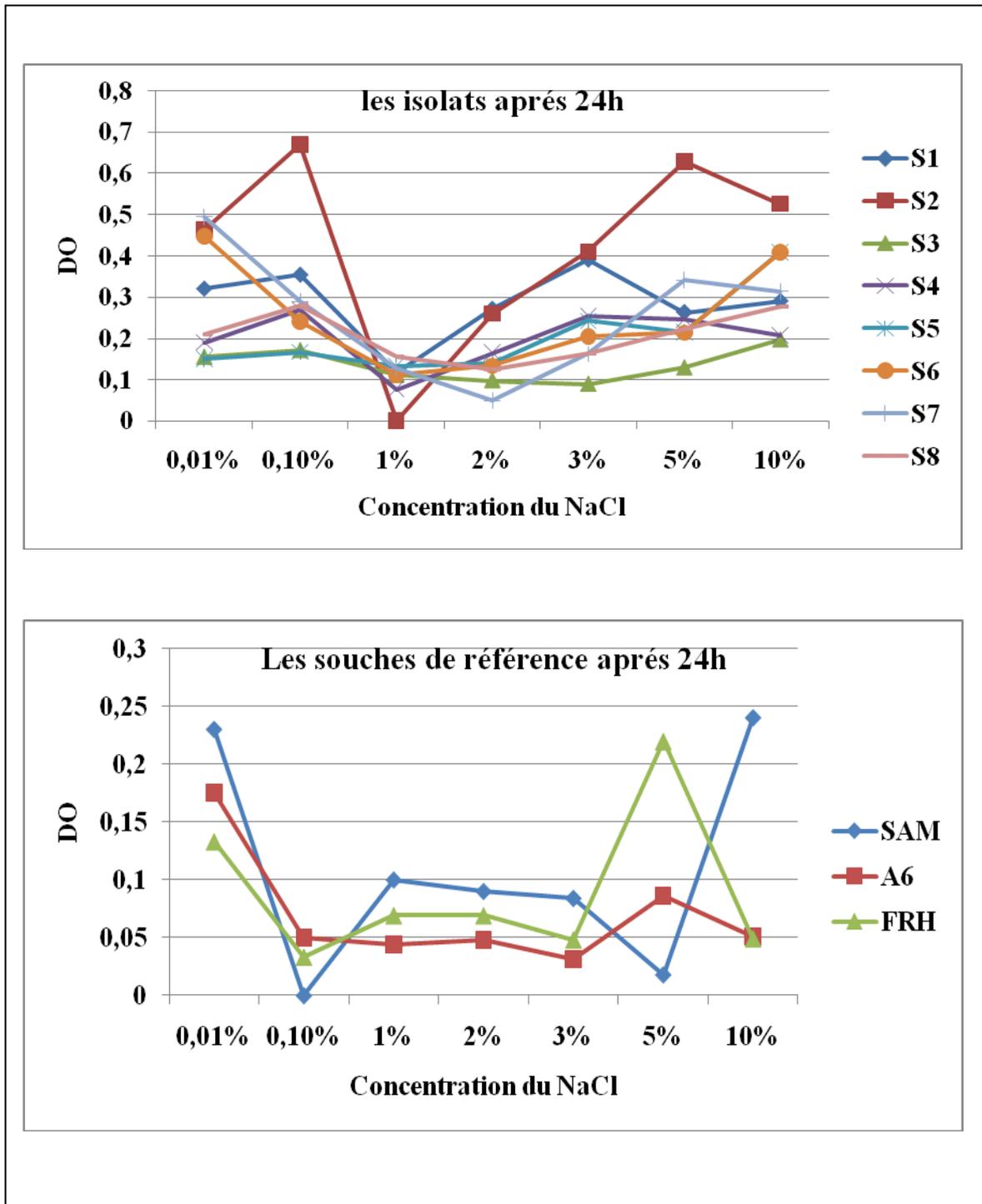


Figure 15 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes souches testées après 24h.

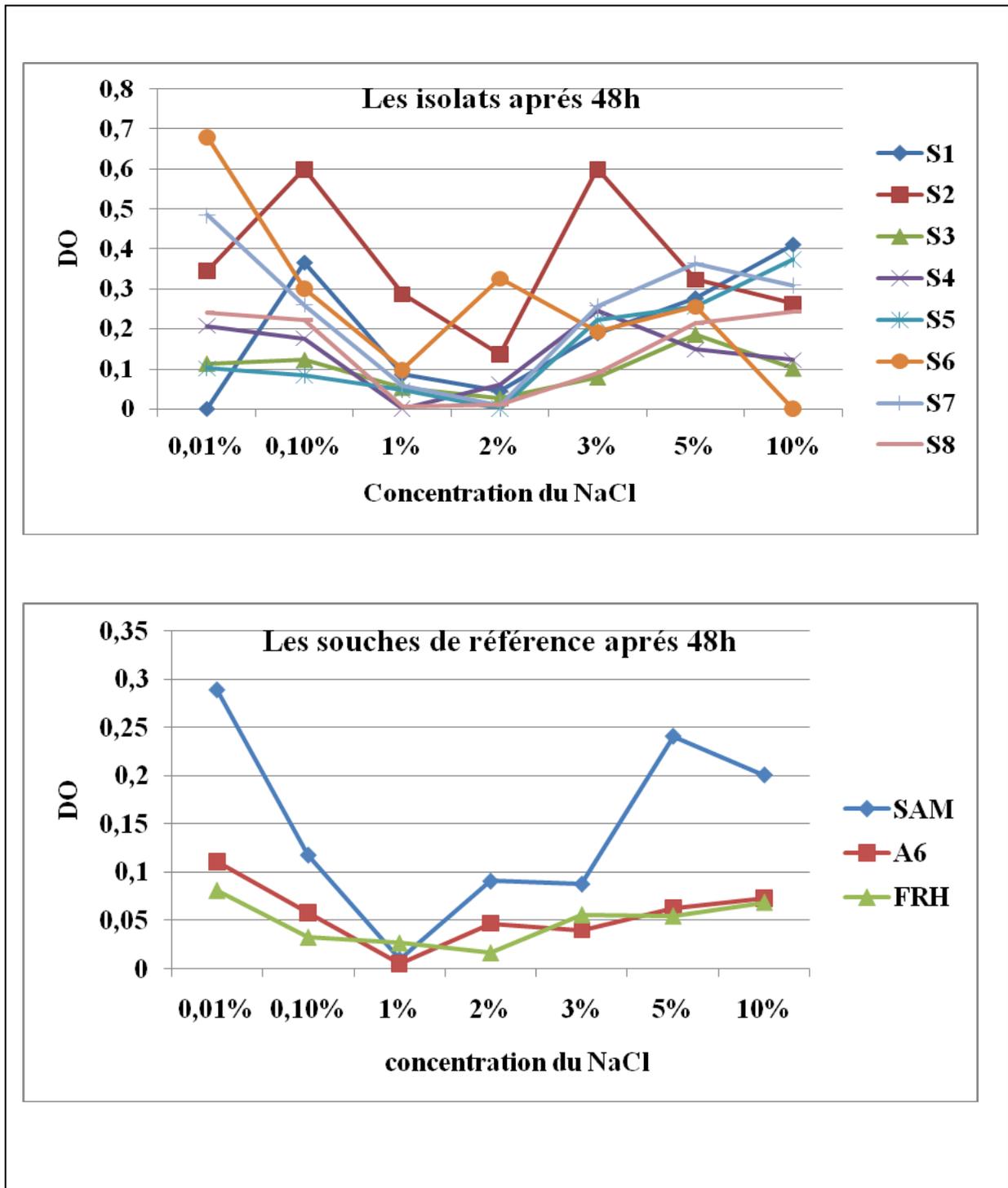


Figure 16 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes souches testées après 48h.

3. Effet du NaCl sur la nodulation

La capacité à induire la formation de nodules sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base pour la caractérisation des bactéries de la famille des rhizobia (Somasegaran et Hoben, 1994).

Après un mois, la nodulation est évaluée, pour toutes les souches (Fig 17).

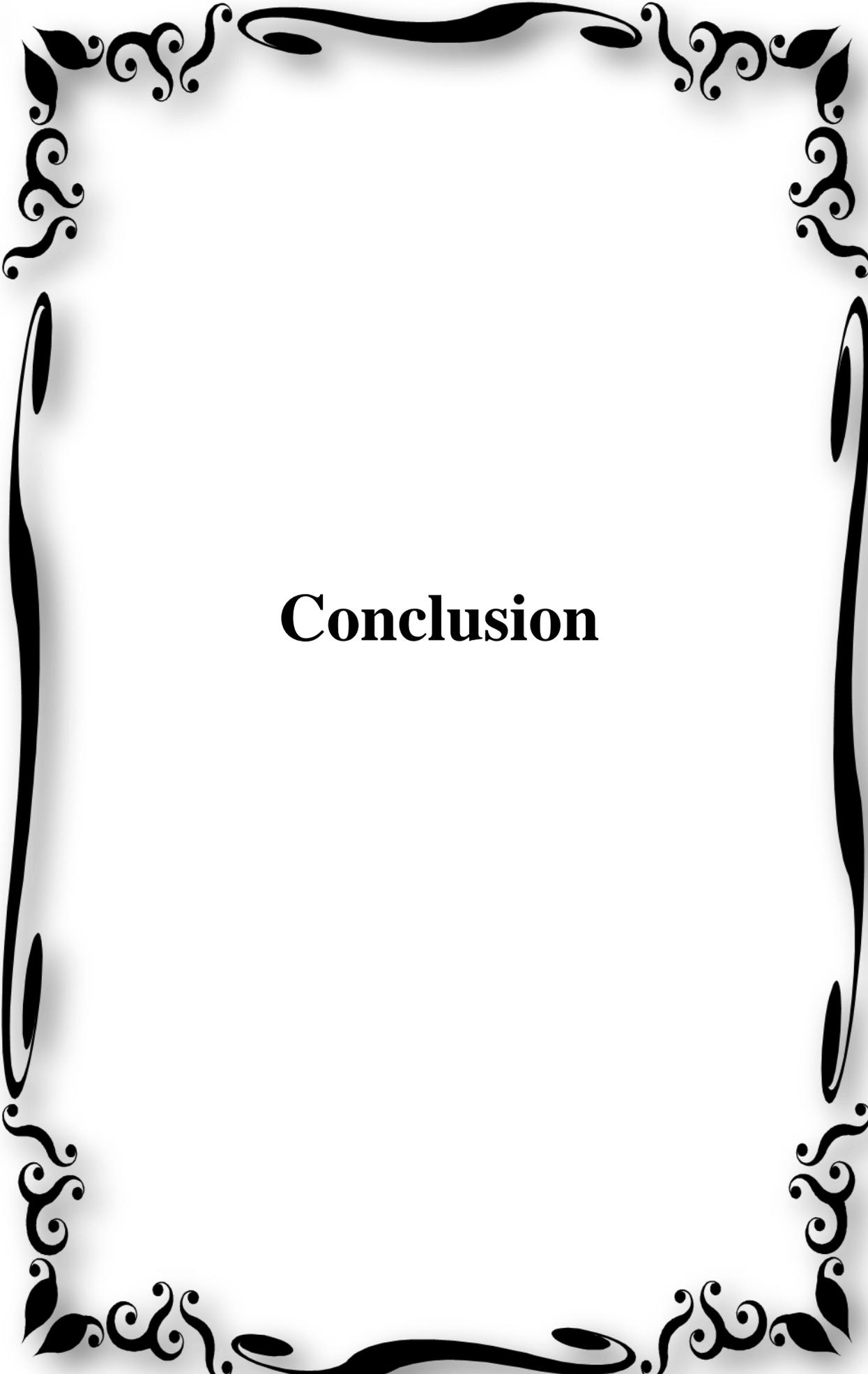
La mise en culture des plantes sur le milieu de Farheus (Solution nutritive) enrichi en concentrations croissantes de NaCl (0% ; 0,1% ; 2% ; 3% ; 5% ; 10%) montre que :

Malgré l'absence de nodules racinaires dans les concentrations (0%, 0,1%), on remarque qu'il y a un bon développement racinaire et aérien avec des feuilles vertes bien formées. Pour les concentrations 2% ; 3% ; 5% ; 10% de NaCl on note qu'il y a un effet inhibiteur sur les plantes, aucun développement avec la mort des plantules (Annexe 03).



Figure 17 : Test de nodulation (absence des nodules racinaires).

Il est à noter que Zahran *et al.*, (2003); Vriezen *et al.*,(2006, 2007) ont constaté que les rhizobia sont généralement plus tolérants aux stress salin comparativement à leurs plantes hôtes. **Kassem *et al.*, (1985)**, montrent que l'influence de NaCl sur les légumineuses peut se manifester dès leur germination. Ainsi, la salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la fixation symbiotique de l'azote est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (**Rao *et al.*, 2002**). Selon Kaseem *et al.*, (1985), la sensibilité de la nodulation à la salinité est très variable, elle peut être inhibée par des petites quantités de NaCl, cette inhibition peut être due à la sensibilité de *Rhizobium* au sel, à la sensibilité de la plante-hôte et à celle de l'interaction *Rhizobium*-plante hôte. La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (**saadallah *et al.*, 2001**).

A decorative border with intricate scrollwork and floral motifs surrounds the central text. The border is composed of four main sections, one for each side, with elaborate flourishes at the corners and midpoints.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail nous avons essayé de voir les effets des facteurs abiotiques (T° , pH et NaCl) sur la croissance des bactéries nodulant les légumineuses du genre lotus situées dans la région d'Ain M'lila et sur la relation symbiotique. En présence des souches témoins de *Rhizobia*

L'étude du partenaire bactérien est commencée par une étude morphologique en utilisant des milieux de culture spécifique et un examen microscopique par coloration de Gram.

L'effet des facteurs abiotique est évalué sur le milieu YMA avec différentes valeurs de Température, sur le milieu YMB avec différentes valeurs du pH et sur le milieu LAS avec différentes concentration du NaCl. Nous avons également réalisé un test de nodulation ou la solution nutritive est préparée avec des concentrations variées du NaCl dont le but est de voir l'effet du NaCl sur la nodulation.

L'aspect morphologique des isolats sur le milieu YMA ont bien poussées au bout de 48 heures d'incubation. Sur le milieu YMA-RC montre que la majorité des isolats absorbent le rouge Congo et on trouve celles qui ne l'absorbent pas et gardent leur couleur blanchâtre et certaines souches modifient le pH sur GPA-BCP. La croissance sur YMA-BTB montre que la plupart d'entre elles ont une faible croissance avec un peu virage de couleur du milieu du vert vers le jaune avec acidification après 48h.

L'examen microscopique des isolats par la coloration de Gram révèle des bâtonnets roses à Gram négatif.

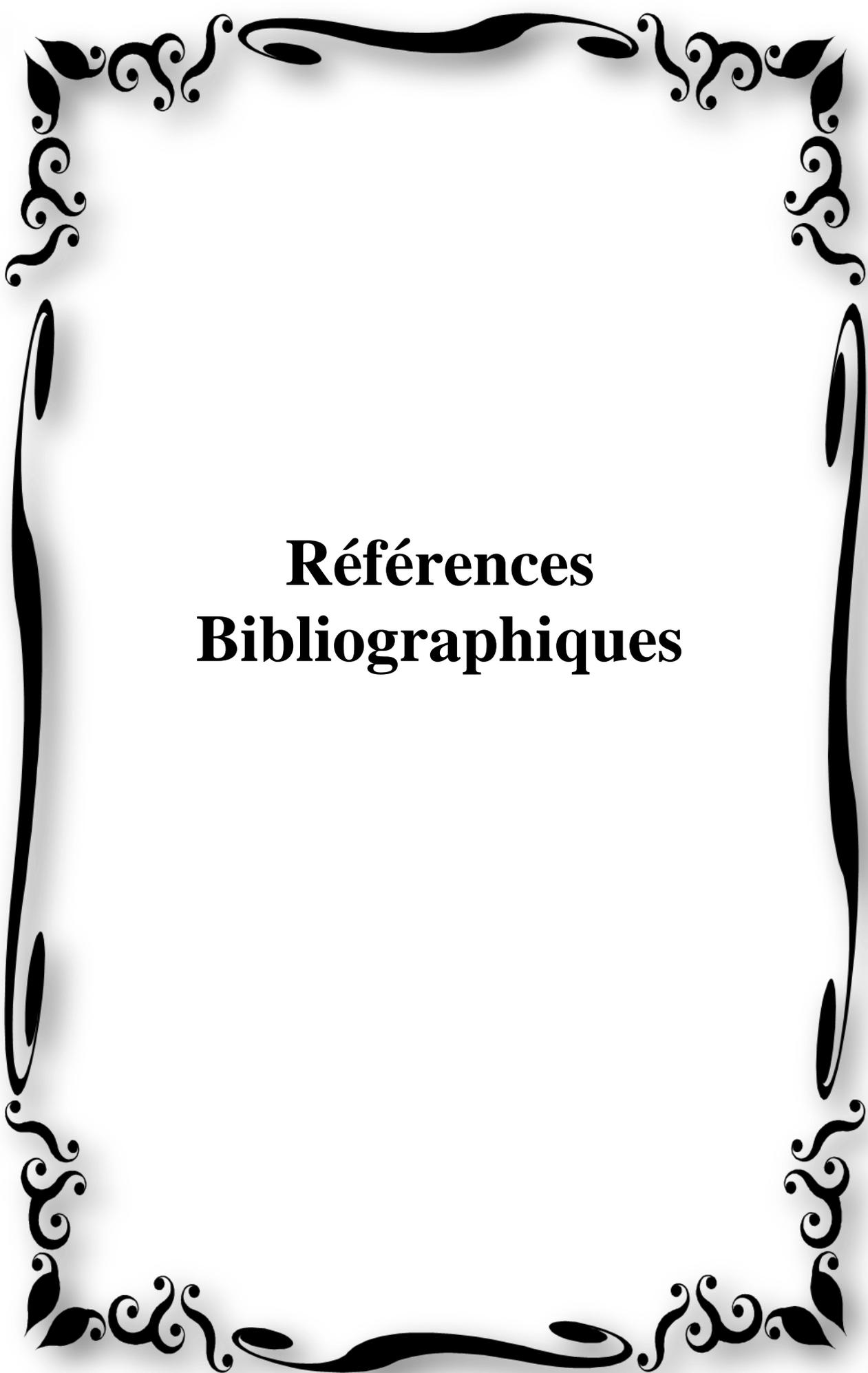
L'étude de l'effet des facteurs abiotique montre que nos isolats et les souches de références sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 50°C avec une bonne croissance dans la température 30°C et 45°C . La croissance des souches est observée entre pH 4 et pH 10 avec un optimum de croissance à pH 8 ainsi que les souches de référence présentent un optimum de croissance à pH=7 après 24h. Concernant le NaCl, après 24 heures, la majorité des souches croissent en présence des concentrations variant de 0,01% à 10%. A une concentration 0,1% la croissance des souches isolées est optimum contrairement les souches de référence à 0,01% et Après 48h les souches S6, S7, S8 et les souches de référence présentent une croissance optimale dans la concentration de NaCl est 0,01%.

Les résultats obtenus de test de nodulation montre que les 8 isolats testés et les 3 souches de référence ne sont pas capables de former des nodules sur les racines de leur plante hôte à cause des contraintes salines.

Les plantes ont bien poussé sur les milieux contenant 0% et 0,1% de NaCl avec un bon développement aérien et des feuilles bien formées vertes ainsi que la partie racinaire. Par contre aucun développement aérien et racinaire dans les milieux contenant 2% ; 3% ; 5% ; 10% de NaCl.

Il est judicieux d'approfondir cette étude en l'améliorant par plusieurs points :

- Elargir l'étude des facteurs abiotiques
- Étude de la nodulation et contrôle des facteurs affectant la nodulation.
- Réaliser un test de nodulation dans le sol
- Etude des mécanismes d'adaptation aux facteurs abiotiques à l'échelle physiologique et moléculaire



**Références
Bibliographiques**

Références bibliographiques

- Arous S.N., 2009:** Métabolisme des protéines et des glucides chez quelques variétés d'haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) sous stress salin au stade de germination. Thèse de magister université d'Oran 1.
- Bado D.V., 2002** .Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor.
- Bélangier E., 1998.** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp.* (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.
- Ben Ahmed A., 2010.** Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine.
- Benselama A., 2015.** Réhabilitation de la culture du *lablab purpureus* L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique. Thèse de doctorat en interaction plante-microorganisme. Université d'Oran ES SENIA, Algérie.
- Berrada H., Benbrahim K., 2014.** Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal 4(6): 616-639.
- Bohnert H.J., Jensen R.G. 1996.** Metabolic engineering for increased salt tolerance -the next step. Aust. J. Plant Physiol. 23(5): 661-667.
- Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L., 2006.** Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG.
- Bordeleau L M., D. Prevost., 1994.** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant Soil.161p.
- Bounaama S., 2014.** Evaluation de l'amélioration de la fertilité des sols emblavés par une légumineuse fourragère en relation avec la symbiose rhizobium dans la région d'El Goléa. Mémoire d'Ingénieur. Dépôt institutionnel de l'université Kasdi Merbah. Ouargla. 78p.
- Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P., 1992.** Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology, M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York.

Broughton W. J., Jabbouri S., Perret X., 2000. Keys to Symbiotic Harmony” Journal of Bacteriology.

Chataigné G., 2007. Déterminations structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. thèse de doctorat . Université Toulouse III - Paul Sabatier, France.

Coba De Le Pena T., Fedorova E., Pueyo J.J., Lucas M.M., 2018. Frontiers in Plant Science.

Collavino M., Riccillo P M., Grasso D H ., Crespi M., Aguilar OM.,2005. GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the *Sinorhizobium meliloti*-Alfalfa symbiotic interaction. Mol. Plant Microbe Interact. 18. pp.742-750.

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

Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C., 2001. Nod Genes and Nod signals and the evolution of the *rhizobium* legume symbiosis. Acta Biochimia Polonia Minireview.

Dénarié J., 2000. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000..

Dhane Fitouri S., 2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du *sulla* du nord (*hedysarum coronarium l.*) et sélection de souches Rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique, Tunisi.

Djebali N., 2008. Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* visà- vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phomamedicago* et *Aphanomyceseuteiches*. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse-Paul III; Sabatier. France 184p.

Domergue O., 2006. Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. p78.

Dommergues Y., Dreyfus B., Hoang G.D., et Duhoux E., 1985. Fixation de l'azote et agriculture tropicale. Présentation de nouvelles plantes fixatrices d'azote, mise au point complète sur les symbioses fixatrices d'azote atmosphérique et leur fonctionnement. La Recherche.162p.

Dupuy Y., Nougier P., 2005. Les microorganismes. Du gène à la biosphère.

- El-Hillali I., 2006.** La symbiose *Rhizobium*-Lupin: Biodiversité des Microsymbiotes et mise en évidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*. These de Doctorat. Université Mohamed V-Agdal Rabat.
- Émile , Duhoux et Michel Nicole., 2004.** Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes. Dunod.
- Flowers T.J., Troke P.F., Yeo A.R., 1977.** The mechanisms of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Plant Physiol. 28(1): 89-121
- Fujishige N.A., Kapadia N.N., De Hoff P.L., Hirsch A.M., 2006.** Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. FEMS Microbiology Ecology 56(2): 195-206
- Gaid S., 2015.** La tolérance à la salinité du pois chiche (*Cicer arietinum L.*) de diplôme magister. Physiologie. Biologie végétale. Université D'Oran ES SENIA, Algérie.
- Ghalem M., 2009.** Contribution à l'étude du développement de la culture du soja ; effets du sol et l'inoculation, rendement et caractérisation des bactéries associées. Thèse de magistère en biotechnologie. Université de d'Oran ES SENIA, Algérie.
- Graham J., 1992.** Salt tolerance of plants. Science Progress. 76: 273-285
- Guan D., Stacey N., Liu C., Wen J., Mysore K.S., Jerez I.T., Vernié T., Tadege M., Zhou C., Wang Z., Udvardi M.K., Oldroyd G.E.D., and Murray J.D., 2013.** Rhizobial Infection Is Associated with the Development of Peripheral Vasculature in Nodules of *Medicago truncatula*. Plant Physiology. 162 (1): 107–115
- Guignard J.L., et Pierre P., 2000.** Biochimie végétale. Dunod.
- Henintsoa M., 2013.** Disponibilité et dynamique du carbone, de l'azote et du phosphore sous association culturale Riz-Haricot soumise à différents types de fertilisation phosphatée apportée à dose croissante. Expérimentation agronomique de Lazaina sur sol ferrallitique de « tanety ». DEA, ESSA de l'université d'Antananarivo. 88 p.
- Hopkins W.G., 2003 :** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119.
- Journet E.P., El-Gachtouli N., Vernoud V., de Billy F., Pichon M., Dedieu A., Arnould C., Morandi D., Barker D.G., and Gianinazzi-Pearson V., 2001.** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodul in gene expressed during mycorrhization in *arbuscule containing cells*. Mol Plant Microbe Interact 14: 737-748

- Khan M.S., Zaidi A., Musarrat J., 2010.** Microbes for Legume Improvement. Springer Wien New York. 535p.
- Kinkema M., Scott P T., Gresshoff M., 2006.** Legume nodulation: successful symbiosis through short and long distance signaling. *Func. Plant Biol.* 33.pp.707-721.
- Lazrek Benfriha F., 2008.** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat- Université Toulouse III - Paul Sabatier, France. 254p
- Lebbida F., 2009.,** Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières. de diplôme de Magister. Ecole nationale supérieure d'agronomie -El Harrache-Alger.101p.
- L'Taief B., Bouaziz S., Manasara Z.A., Hajji M., Lachaal M., 2009.** Effet de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium sp. et* du régime des pluies sur la production et la teneur en azote du pois chiche. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 .pp. 537-544.
- Machrafi Y., 2001.** inhibition de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire de maîtres sciences Université Laval. Canada.199p.
- Madigan M., et Martinko., 2007.** Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris.
- Morot-Gaudry J.F., 1997 .** Assimilation de l'azote chez les plantes : Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Institut national de la recherche agronomique, 424 p.
- Moschetti G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., 2005.** Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDN Aanalysis to discriminate genotypes.
- Munns R., 2005.** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167(3): 645-663.
- Ouslim S., 2016.** BLN associées aux légumineuses alimentaires (*Vicia faba L*) dans l'ouest Algérien (caractérisation et importance). de diplôme de doctorat. Université D'Oran.
- Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004.** Organogenesis of legume root nodules. *Int RevCytol.*
- Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement adaptation physiologique.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W.J., 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.*

Perry J.J., Stalex J.T et Lory S., 2004. Microbiologie cours et questions de révision. Edition Person Education France. P 617-634.

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. CNRS, ed. Paris, France.

Raven., Evert et EichhornI., 2007. Biologie végétale. 2ieme édition. Edition de boeck. Paris - France: 653-660.

Roger P., 1996 .La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement. Conférence debat de l'ORSTOM. Paris Xe France.

Romeo y.,Bouvier J.,Gutierrez.,2001.La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *lactobacillus plantarum* (mini-revue).Toulouse Cedex .france.

Saadallah K., Drevon J.J., Abdelly C., 2001.Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21 : 627–634.

Saoudi M., 2008. Les bactéries nodulant les legumineuses (B.N.LP) caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalusarmatus*. Mémoire de Magister. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri de Constantine. 99p.

Sebihi F., 2008. Les Bactéries Nodulants les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie.110p.

Segovia L., Pinero D., Palacios R., Martinez Romero E., 1991. Genetic structure of a soil population of non symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*57.pp. 426-433.

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

Somasegaram P., Hoben H.J., 1994. Hand book for Rhizobia. Springer verlage New York.Inc .450p.

Sousou S., 2013.Adaptation de la symbiose Fabacées-*Rhizobium* aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium* .these de doctorat en Microbiologie, Parasitologie / Agriculture Durable. Institut supérieur agronomique de chott meriam. Université de Sousse, Tunis.

Squartini A., Struffi P., Do-ring H., Seleska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S., and Nuti M. P., 2002. *Rhizobium sulla* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*): The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. Int J Syst Evol Microbiol.

Terefework Z., 2002. Diversity and Phylogeny of *Rhizobium* galegae, and reflections on molecular evolution of *rhizobium*-legume symbiosis. ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN.

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie. 166p

Vernie T., 2008. Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Médicago Truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat, université ToulouseIII-paul Sabatier, Toulouse. 263p.

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

Zahran H.H., 1999. *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe Conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63(4): 968-989.

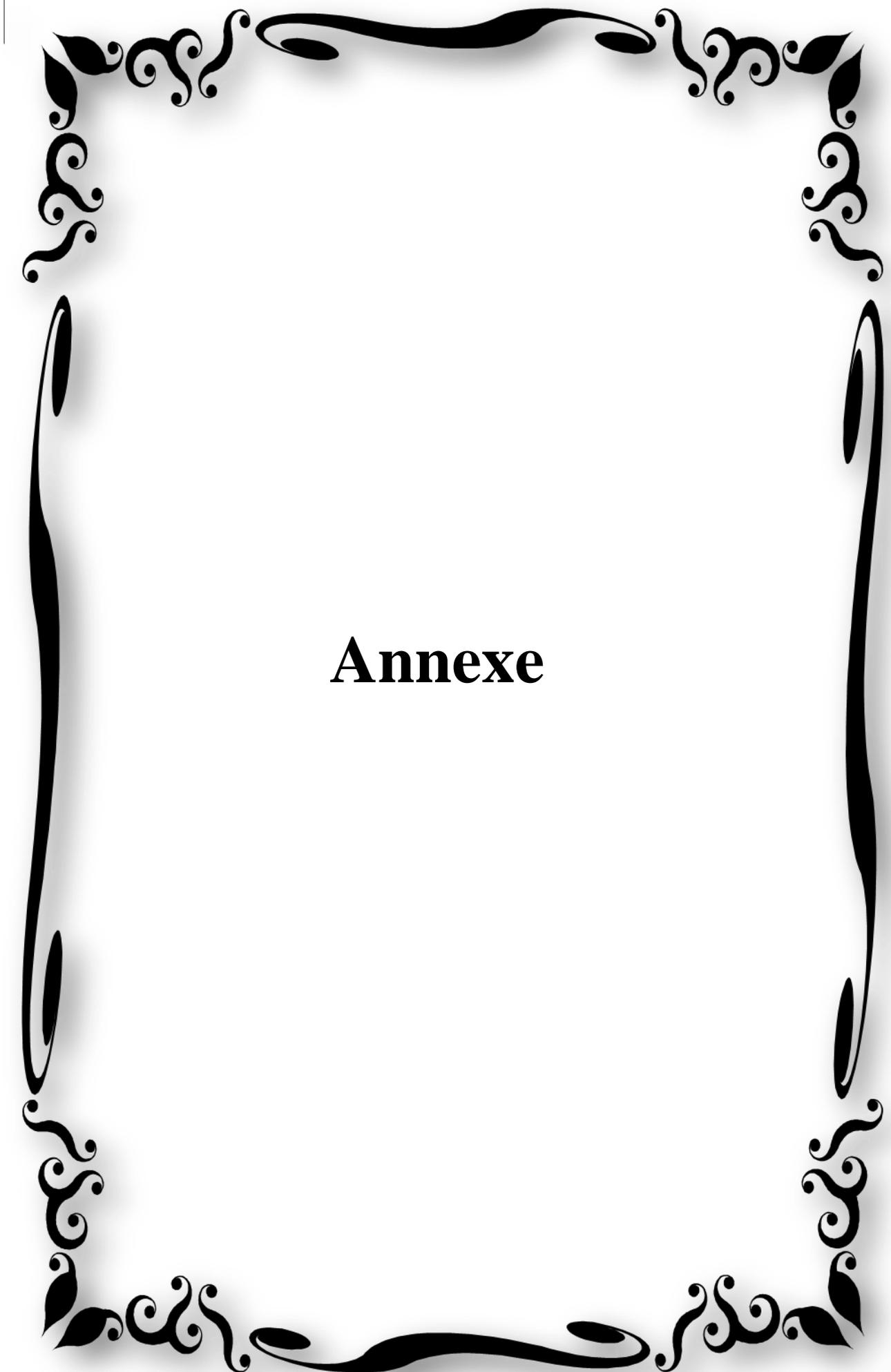
Zakhia F., et de Lajudie P., 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL).

Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., Dreyfus B., and de Lajudie P., 2004. Characterisation of wild legumes nodulating bacteria (LNB) in the infrared zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. pp27: 143-153

Zhifang L., 2003. In Parida, A.K; Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60: 324-349.

Site d'internet

(1) Source: <http://www3.ac-clermont.fr/pedago/svt/pagex.php?rubrique=8&num=542>



Annexe

Annexe 01:**Milieux de culture et solutions utilisés****Composition de milieu YMB (Yeast mannitol broth) en g/l (Vincent, 1970).**

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA (Yeast mannitol agar) en g/l (Vincent, 1970).

YMB	1000 ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+ rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge congo (0.25g rouge congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu YMA+ bleu de bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5 ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0. 5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu GPA (Glucose peptone agar) + pourpre de bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100 ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement de milieu.

Composition du milieu YMA+CaCO₃

YMB	500ml
Agar	7,5g
CaCo ₃	1,5g
PH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20 min

Composition de la solution nutritive en g/l (Fahreus, 1957).

CaCl ₂	0.10
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.10
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0.15
Citrate de fer	0.005
Micro éléments	1ml

Solution micro éléments g/l

H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ 5H ₂ O	0.22
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.14
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Composition de milieu lactate-aspartate de sodium (LAS)(Gloux et Le Rudelier, 1989).

Solution A: (g/l)	
KH ₂ PO ₄	0.3
NaHPO ₄	0.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
Eau distillée	1000ml

Solution B: (mg/l)	
H ₃ BO ₄	10
ZnSO ₄	1
CuSO ₄	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.1
Eau distillée	1000ml

Biotine	2g
Acide aspartique	100mg
Acide lactique	0.74mg
Eau distillée	1000ml

Préparation de milieu

- Prendre 100ml de la solution A.
- Mélanger avec 20ml de la solution B ensuite compléter à 1000ml.
- Additionner l'acide lactique et l'acide aspartique.
- Ajuster le pH à 7.
- Autoclaver à 120 °C pendant 20minutes.

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu.

On ajoute dans chaque cas la concentration sélectionnée de NaCl.

Composition de milieu TYA (Tryptone yeast agar) en g/l (Beringer, 1974).

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.87
Eau distillée	100ml
Agar	12
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20minutes.

Annexe 02 :

Tableau 01 : effet de pH

PH souches	4		5		6		7		8		9		10	
	24H	48H												
S1	0,269	0,116	0,339	0,290	0,577	1,463	0,913	0,335	1,049	0,908	0,766	1,113	1,044	0,922
S2	0,221	0,180	0,314	0,037	0,467	0,798	0,808	0,984	1,102	0,961	1,085	0,798	0,823	1,643
S3	0,135	0,032	0,304	0,158	0,410	0,768	0,897	1,239	0,941	0,667	1,078	0,927	1,068	0,822
S4	0,084	0,090	0,457	0,349	0,631	0,581	0,958	0,965	0,907	1,321	0,865	1,008	0,720	1,087
S5	0,160	0,161	0,540	0,392	0,870	0,560	0,571	1,110	0,304	0,756	0,518	0,536	0,581	1,334
S6	0,432	0,555	0,494	0,412	1,075	0,904	0,941	1,220	1,488	0,855	0,866	1,462	1,044	0,998
S7	1,323	0,596	0,753	0,663	1,096	1,191	1,256	1,324	1,089	0,770	0,814	1,303	0,817	1,022
S8	0,625	0,709	0,384	0,565	0,590	1,002	0,991	1,271	1,352	1,704	1,087	1,292	0,799	1,233
A6	0,703	0,673	0,935	0,954	0,738	0,560	0,699	1,063	0,884	1,110	0,967	1,071	0,842	1,010
SAM	0,253	0,158	0,576	0,766	0,479	0,768	0,851	0,920	0,613	0,560	0,652	0,788	0,584	0,624
RHF	0,783	0,614	1,028	0,899	0,978	1,371	1,158	0,881	0,916	1,508	0,943	1,007	0,936	1,031

Tableau 02 : effet de NaCl

Nacl Souches	0,01%		0,1%		1%		2%		3%		5%		10%	
	24h	48h												
S1	0,321	0,259	0,355	0,366	0,118	0,086	0,272	0,045	0,392	0,189	0,264	0,277	0,291	0,411
S2	0,465	0,345	0,671	0,600	0,328	0,286	0,260	0,135	0,411	0,600	0,629	0,323	0,527	0,262
S3	0,156	0,113	0,172	0,122	0,112	0,054	0,099	0,027	0,090	0,079	0,130	0,185	0,198	0,101
S4	0,190	0,208	0,269	0,176	0,077	0,119	0,165	0,060	0,253	0,246	0,245	0,148	0,207	0,122
S5	0,151	0,102	0,167	0,084	0,132	0,047	0,139	0,001	0,243	0,222	0,215	0,256	0,410	0,374
S6	0,449	0,681	0,242	0,301	0,112	0,098	0,135	0,326	0,205	0,193	0,215	0,256	0,410	0,374
S7	0,494	0,485	0,289	0,260	0,126	0,059	0,049	0,009	0,162	0,257	0,341	0,364	0,313	0,309
S8	0,209	0,240	0,280	0,221	0,156	0,005	0,124	0,010	0,162	0,090	0,223	0,214	0,278	0,243
SAM	0,230	0,289	0,059	0,118	0,100	0,010	0,090	0,091	0,084	0,088	0,018	0,241	0,240	0,201
A6	0,175	0,111	0,050	0,058	0,044	0,005	0,048	0,047	0,031	0,040	0,086	0,063	0,051	0,073
FRH	0,133	0,081	0,033	0,033	0,069	0,027	0,069	0,017	0,048	0,056	0,220	0,055	0,049	0,069

Annexe 03 : Test de nodulation

