

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire/ Biologie moléculaire des procaryotes

Thème

Transformation bactérienne entre les Rhizobiums

Présenté par :

LARABA Meryem

ROBAI Wafa

ZEMITI Halima

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme TORCHE Asma (M.A)

Examinatrice : Mme RAHMANI BOUABID Rima (M.A)

Promoteur : Mr BENOUARETH Djamel Eddine (Pr)

Juin 2011

Remerciements

Nous tenons en premier lieu à remercier le bon Dieu de nous avoir donné la force et le courage pour terminer ce modeste travail.

Un grand merci au professeur Benoumeïth Djumelcutine pour avoir encadré ce travail, par sa disponibilité, ses critiques, ses précieux conseils apportés et pour avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce projet ainsi que pour les longues heures qu'il nous a consacré pour la finalisation du manuscrit.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury, Mme Rahmani Baahide Rima qui a accepté d'examiner notre travail, Mme Forche Asma qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury.

Nous remercions chaleureusement tous les enseignants du département de biologie à l'université de 08 Mai 1945 de Guelma de nous avoir transmis leurs savoirs le long de notre cycle universitaire.

Nous souhaiterions enfin finir par une pensée envers nos parents et nos proche, bien sûr pour leur soutien tout au long de nos études, nous n'oublions pas nos plus chères amies qui nous ont accompagnés durant toutes ces années.

Sommaire

Produced with ScanTOPDF

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01
Chapitre I : Partie bibliographique	
I-Fixation biologique de l'azote.....	02
I-1 L'azote.....	02
I-2 Fixation biologique de l'azote.....	02
I-2-1 Les fixateurs libres.....	03
I-2-2 les fixateurs symbiotiques.....	03
I-3 Le mécanisme enzymatique : nitrogénase.....	04
I-3-1 Structures.....	04
I-3-2 Fonction et régulation.....	04
II-Aperçu général sur la symbiose.....	05
II-1 Généralité.....	05
II-2 Mécanisme et spécificité de la reconnaissance symbiotique.....	06
II-3 Echange entre les deux partenaires.....	08
III-Etablissement de symbiose rhizobium.....	09
III-1 Famille de la plante hôte.....	09
III-1-1 Légumineuse étudiée *pois chiche*.....	10
III-2 Rhizobium.....	11
III-2-1 Définition.....	11
III-2-2 Taxonomie.....	11
III-2-4 Caractères généraux.....	15
III-3 Nodulation.....	16
III-3-1 Processus de nodulation.....	16
III-3-1-1 Echange de signal d'infection.....	16

III-3-1-2 Reconnaissance et attachement.....	16
III-3-1-3 Formation de nodules.....	17
III-3-1-4 Recourbement de poils absorbants et la formation de cordon d'infection.....	17
III-3-1-5 Développement de nodule et libération des bactéries.....	18
III-4 La structure morphologique des nodules.....	20
III-5 La génétique de nodulation.....	20
III-5-1 Chez les rhizobiums.....	20
III-5-1-1 Les gènes nod.....	21
III-5-2 Chez la plante.....	22
III-6 Les facteurs influençant la nodulation.....	22
III-6-1 Les contraintes abiotiques.....	23
III-6-2 Contraintes biotiques.....	24
VI- Transformation bactériennes.....	25
VI-1-1 Transformation naturelle.....	25
VI-1-1 Définition.....	25
VI-1-2 Mécanisme.....	26
VI-1-2-1 Chez les bactéries à Gram positif.....	26
VI-1-2-2 Chez les bactéries à Gram négatif.....	27
VI-2 Transformation artificielle.....	28
 Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I-Matériel et méthodes.....	30
I-1 Caractères morphologiques.....	30
I-1-1 Ensemencement sur milieu de culture.....	30
I-1-2 Examen microscopique.....	30
I-1-2-1 coloration de Gram.....	30
I-2 Conservation des isolats.....	31
I-3 Extraction de l'ADN à partir des souches isolées.....	31

I-4 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.....	33
I-4-1 Préparation de gel.....	33
I-4-2 Préparation des échantillons à analyser.....	35
I-4-3 Dépôt.....	35
I-4-4 Migration.....	35
I-4-5 L'observation.....	36
I-5 Transformation bactérienne.....	36
I-5-1 Préparation des bactéries compétentes.....	36
I-5-2 Transformation bactérienne.....	37
I-6 Etude de l'effet de la transformation.....	37
I-6-1 Etude de l'aspect morphologique.....	37
I-6-1-1 Caractères culturaux.....	37
I-6-1-2 Examen microscopique.....	37
I-6-2 Etude de quelques caractères biochimiques.....	38
I-6-2-1 Recherche de la catalase.....	38
I-6-2-2 Recherche de l'oxydase.....	38
I-6-3 Etude de la tolérance aux contraintes abiotiques.....	39
I-6-3-1 Tolérance à la température.....	39
I-6-3-2 Tolérance au pH.....	39
I-6-3-3 Tolérance à la salinité.....	39
I-6-3-4 Tolérance aux métaux lourds.....	39
I-7 Authentification des bactéries « Test de nodulation ».....	39
I-7-1 Stérilisation du sol.....	40
I-7-2 Préparation des pots.....	40
I-7-3 Germination des grains.....	40
I-7-4 Semis des grains germées.....	41

I-7-5 Préparation des inoculums.....	42
I-7-6 Inoculation des graines.....	42
Chapitre III : Résultats et discussion	
I-Etude des caractères morphologiques.....	43
I-1 Sur milieu YEMA additionné de rouge Congo.....	43
I-2 Examen microscopique.....	44
II-Extraction de l'ADN plasmidique.....	45
III-Electrophorèse.....	45
IV-Transformation.....	46
IV-1 Etude de l'aspect morphologique.....	46
IV-1-1 Sur milieu YEMA additionné de rouge Congo.....	46
IV-1-2 Examen microscopique.....	47
IV-2 Tests enzymatique.....	48
IV-3 Etude de quelques caractères physiologiques.....	48
IV-3-1 Tolérance à la température.....	48
IV-3-2Tolérance aux Ph.....	50
IV 3 3 Tolérance à la salinité.....	51
IV-3-4 Tolérance aux métaux lourds.....	57
V- Test de nodulation.....	60
Conclusion.....	61
Résumé	
Références bibliographique	
Annexe	

Liste des figures

Figure 01 : Structure de la nitrogénase.....	04
Figure 02 : Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote en ammoniac.....	05
Figure 03 : Echange de signaux chimiques entre rhizobium et racine de légumineuse.....	08
Figure 04 : la plante de pois chiche.....	10
Figure 05 : Développement des nodules sur les racines de la plante hôte.....	19
Figure 06 : Coupe d'une nodosité.....	20
Figure 07 : Mécanisme de la transformation chez les bactéries à Gram positif.....	27
Figure 08 : Mécanisme de la transformation chez les bactéries à Gram négatif.....	28
Figure 09 : Préparation des pots.....	40
Figure 10 : Germination des graines.....	41
Figure 11 : Semis des graines germées.....	41
Figure 12 : Aspect macroscopique des souches 3,6 et 9.....	43
Figure 13 : Aspect microscopique des souches 3, 6 et 9.....	44
Figure 14 : Profil électrophorétique des plasmides extraits des souches.....	45
Figure 15 : Aspect macroscopique des souches transformées 9/3 et 9/6.....	46
Figure 16 : Aspect microscopique des souches transformées 9/3 et 9/6.....	47
Figure 17 : Effet de la température sur la croissance des souches 3, 6, 9, 9/3 et 9/6.....	50
Figure 18: Effet du Ph 1,3 et 12 sur la croissance des souches 3, 6, 9, 9/3 et 9/6.....	52
Figure 19 : Effet du Ph 5 et 9 sur la croissance des souches 3, 6, 9, 9/3 et 9/6.....	53
Figure 20 : Effet de la concentration 11% de Na Cl sur la croissance des souches.....	55
Figure 21 : Effet de la concentration 8% de Na Cl sur la croissance des souches.....	56
Figure 22 : La bonne croissance des souches à 5% de Na Cl.....	56
Figure 23 : Effet de la concentration 2% sur la croissance des souches.....	57
Figure 24 : Effet des différentes concentrations des métaux lourds sur la croissance.....	60

Liste des tableaux

Tableau I : La classification actuelles des rhizobiums.....	12
Tableau II : Caractères des rhizobiums.....	15
Tableau III : Mise en évidence des enzymes de catalase et oxydase.....	48
Tableau VI : Effet du Ph sur la croissance rhizobienne.....	51
Tableau V : Tolérances des rhizobia à différentes concentration de NaCl.....	54
Tableau IV : Effet des différentes concentrations des métaux lourds sur la croissance.....	58

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Produced with ScantOPDF

Introduction

À l'échelle de la biosphère, la quantité d'azote disponible est l'un des facteurs limitant majeurs de la croissance des plantes. Néanmoins, bien que l'atmosphère soit composée de 78% de diazote, les plantes ne peuvent pas l'utiliser pour survenir à leurs besoins.

L'utilisation de cette source d'azote est limitée à certains procaryotes (Cyanobactéries, actinomycètes, bactéries) appelés diazotrophes.

La fixation de l'azote peut être le fait des bactéries libres, cependant la fixation symbiotique représente la plus grande part des apports d'azote du sol.

En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia-légumineuse a joué un rôle considérable dans le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation de ressources naturelles écologiquement non polluantes.

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une légumineuse capable d'établir une interaction symbiotique avec les rhizobia. Cette interaction est très spécifique, impliquant deux genres bactériens.

Le premier induit des gros nodules effectifs et le deuxième donne des petits nodules non fixateurs d'azote.

L'objet de notre travail est d'essayer une transformation *in vitro* afin de voir l'acquisition possible de certains caractères cultureux, morphologiques et physiologiques ; notamment l'ineffectivité et l'effectivité des souches.

Notre étude est subdivisée en deux grandes parties : une partie théorique et une partie expérimentale.

Nous présentons dans la première partie des informations et des connaissances à propos de l'azote et la symbiose entre les rhizobiums et la plante de légumineuse (le pois chiche). La deuxième partie consiste à extraire l'ADN plasmidique à partir des souches inefficaces et le transférer à une souche possédant un faible pouvoir d'ineffectivité. Ensuite nous vérifions l'acquisition possible de certains caractères par la bactérie réceptrice.

Chapitre I

Etude bibliographique

Produced by ScantOPDF

I-Fixation biologique de l'azote

I-1 Azote

L'azote est un élément essentiel pour toutes les formes de vie sur la planète. La plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume, est constituée d'azote (N_2 ou diazote) un gaz incolore et inodore (Hopkins, 2003). Il représente près de 4/5, sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante (Parent, 1999). Il est donc combiné à la matière organique mais on le trouve aussi à l'état minéral sous forme de NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^- .

C'est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone, c'est un constituant essentiel des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes (Hopkins, 2003). Il est également un facteur clé et limitant pour la production agricole (Parent, 1999); il favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, et favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Bado, 2002).

La concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 5 % sur une base de matière sèche (Parent, 1999). L'insuffisance ou la carence de cet élément sont aussi néfastes que les excès (Parent, 1999 ; Tourte *et al.*, 2005).

I-2 Fixation biologique de l'azote :

La fixation biologique de N_2 est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse (Pelmont, 2005).

On appelle fixation biologique de l'azote le processus impliquant la transformation de l'azote gazeux (N_2) en ammoniac de manière biologique (réduction du diazote en ammoniac) (Bogusz et Franche, 1985).

Les rares créatures terrestres capables d'absorber directement l'azote atmosphérique sont des bactéries.

Ces procaryotes fixateurs d'azote, remplissent une fonction écologique irremplaçable, puisque jusqu'à la découverte des procédés de synthèse industrielle de l'ammoniac, ils étaient les seuls capables à faire entrer l'azote dans les cycles biologiques (Davet, 1996).

Certains de ces microorganismes fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose (Pelmont, 2005).

I-2-1 Fixateurs libres

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces (Hopkins, 2003).

L'intensité de la fixation de l'azote par les bactéries libres est très variable selon les lieux et les conditions climatiques. On les rencontre en conditions anaérobies ou microaérophiles, mais aussi en conditions aérobies (Davet, 1996).

Les espèces aérobies comme le genre *Azotobacter*, ont développé plusieurs mécanismes pour protéger leur nitrogénase contre le dioxygène. Ainsi elles métabolisent celui-ci très rapidement ce qui réduit au minimum la diffusion intracellulaire du gaz. Les espèces anaérobies tel que *Clostridium pasteurianum* possèdent la même aptitude.

En plus des bactéries, plusieurs genres de cyanobactéries comprennent des espèces fixatrices d'azote. Leur nitrogénase est enfermée dans un hétérocyste, une structure cellulaire spécialisée qui fournit les conditions anaérobies nécessaire à la fixation de l'azote (Tortora *et al.*, 2003).

La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996).

I-2-2 Fixateurs symbiotiques

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres. La plupart des espèces économiquement importantes, telles que les bactéries du *Rhizobium*, vivent au sein de nodosités spécialisées sur les racines de légumineuses. La formation de ces nodosités exige une relation génétique intime entre les bactéries et la plante.

Les plantes de la famille des légumineuses vivent en association étroite avec des bactéries fixatrices d'azote appartenant au genre *Rhizobium* (Davet, 1996).

Plus de 200 espèces appartenant à d'autres familles que les légumineuses vivent aussi en association symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote (Frontier *et al.*, 2004); ce sont des actinomycètes qui s'associent avec ces dernières (Hopkins, 2003).

I-3 Mécanisme enzymatique : Nitrogénase

I-3-1 Structure

La nitrogénase est une enzyme très conservée tant au niveau biochimique ou génétique. L'enzyme a été purifiée à partir de fixateurs libres. Toutes fois des préparations ont été obtenues à partir de bactéroïdes isolées de nodosités des légumineuses.

La nitrogénase est un complexe enzymatique formé de deux métalloprotéines qui sont souvent appelées Protéine I et Protéine II.

Protéine I ou nitrogénase : un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ sa masse moléculaire est de 245 KDa; il contient un cofacteur à fer et à molybdène, au niveau duquel l'azote moléculaire est réduit en ammoniacque.

Protéine II ou réductase : un homodimère sa masse moléculaire est de 64 KDa; il transfère les électrons à la protéine I (François et Gaudry, 1997 ; Howard et Rees, 2000) (Fig 01).

Le transfert des électrons de la réductase à la nitrogénase est couplé à l'hydrolyse de l'ATP par la réductase (site web n°01).



Figure 01 : Structure de la nitrogénase. (Broughton *et al.*, 2000)

1-3-2 Fonction et régulation

La fixation de N_2 dans les nodules des légumineuses suit l'équation générale :



Le mécanisme réactionnel de la nitrogénase met en jeu une interaction complexe entre la protéine I et II. La protéine II joue le rôle de transporteur d'électrons spécifiques à la réaction. Le donneur d'électrons physiologique est une ferrédoxine (François et Gaudry, 1997).

La Fe-protéine est réduite par la ferrédoxine, et c'est cette Fe-protéine réduite qui transfère les électrons à la Mo-Fe-protéine qui catalyse à la fois la réduction du diazote gazeux et la production d'hydrogène (Hopkins, 2003). Deux molécules d'ATP sont hydrolysées par pair d'électrons transférés, de sorte que 8 cycles sont nécessaires à la réduction complète du substrat et la production d'hydrogène (Fig 02).

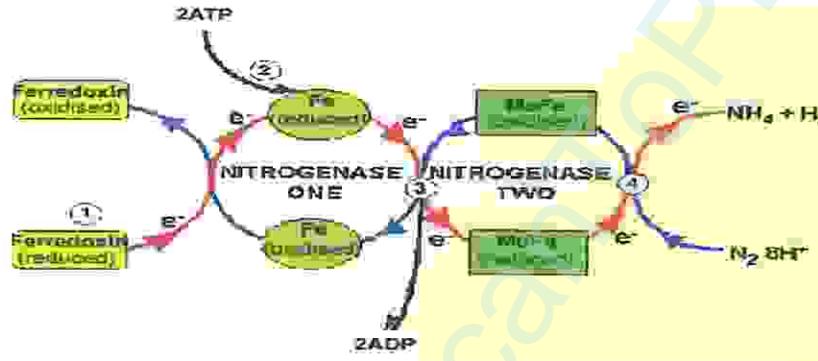


Figure 02 : Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote en ammoniac (Sprent, 1984)

II- Aperçu général sur la symbiose

II-1 Généralités :

Les associations symbiotiques ont souvent fait l'objet de nombreux travaux. La nature double de ces associations n'a été comprise que très progressivement. En 1877 l'allemand *Frank* proposa le terme « *symbiotismus* » pour désigner la coexistence régulière de deux organismes différents. En 1879, *De Bary*, qui avait certainement eu des contacts avec *Frank*, introduit le terme de « *symbiosis* » (du grec *syn*, avec, et *bios*, vie) pour désigner l'association.

Dans sa définition d'origine, *De Bary* entendait par symbiose ; la vie en commun d'organismes de noms différents- et donc, d'origines systématiques distinctes (Selose, 2009).

Il est aujourd'hui commun de dire que les symbioses sont sources de diversité et d'adaptation. De nombreux exemples de symbioses existent dans le monde du vivant : elles prennent des formes très diversifiées (Chataigné, 2007).

Ici on s'intéresse à une association symbiotique particulière, la symbiose fixatrice d'azote, dont l'exemple le plus étudié est la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses car il concerne beaucoup d'espèces d'intérêt agronomique.

Le processus d'une symbiose fixatrice d'azote se traduit par la capacité des rhizobiums à induire la formation de nodosités au niveau des racines ou des tiges d'une plante hôte particulière.

La présence de nodosités chez les légumineuses était historiquement bien connue, mais leur origine était controversée. En 1887, *Hellriegel* et *Wlfarth* ont montré que la fixation de l'azote est associée avec la nodulation des racines des légumineuses. La première preuve que les bactéries sont à l'origine de la formation des nodosités chez les légumineuses a été fournie par *Beyerinck* en 1890.

En fait, la formation de nodosités survient quand les rhizobiums ; partenaire bactérien ou symbionte, pénètrent leurs hôtes d'une manière strictement coordonnée et contrôlée. (El-hilali, 2006).

Chez les légumineuses, le symbionte est une bactérie appartenant à l'un des trois genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, ou *Azorhizobium* (Davet, 1996).

Dans la relation symbiotique *Rhizobium*/plante hôte, deux critères sont à prendre en compte :

- 1) **Infectivité** : aptitude à noduler.
- 2) **Effectivité** : aptitude à fixer l'azote atmosphérique en symbiose.

Ces deux critères peuvent être appréciés du point de vue de la bactérie ou de la plante hôte et sous l'influence des conditions environnementales (Duhoux et Nicole, 2004).

Selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo- ou ecto-symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ecto-symbiose ; sinon, on parle d'endosymbiose. L'endosymbiose peut être intra- ou extracellulaire (Broughton *et al.*, 2000).

II-2 Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique

La symbiose légumineuse/rhizobium est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie.

L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique des deux partenaires. La reconnaissance entre les deux symbiotes est rendue possible par des échanges de signaux moléculaires (Chataigné, 2007).

Les interactions entre les légumineuses et les rhizobiums se produisent dans la rhizosphère. La plante étant par définition immobile, elle doit attendre que les *Rhizobia* entrent dans sa rhizosphère. Toutefois la mobilité de la bactérie et le chemotactisme ne jouent qu'un rôle restreint dans la reconnaissance (Fellay *et al.*, 1995). Dans ce contexte il apparaît difficile que les deux partenaires se rencontrent.

C'est sans compter sur le fait que la plante exsude dans son proche environnement une grande diversité de nutriments qui, par leur nature (source de carbone, d'azote, etc...), attirent à elle des microorganismes symbiotiques et pathogènes (Barbour *et al.*, 1991). 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-hilali, 2006). Pour réaliser une sélection dans cette flore, la plante sécrète en continu des flavonoïdes. Lorsqu'un *Rhizobium* compatible pénètre dans sa rhizosphère, la concentration en flavonoïde augmente.

Ces flavonoïdes exsudés par les racines de la plante vont également induire la transcription des gènes de la nodulation qui codent pour la production de facteurs Nod. Ces composés sont libérés dans la rhizosphère et perçus en retour par le végétal (Fig 03). Les facteurs Nod sont le point de départ d'une communication indispensable à la mise en place spécifique de la symbiose fixatrice d'azote, ils sont impliqués dans les stades les plus précoces de la reconnaissance entre les deux partenaires. Une fois reconnus, ces facteurs Nod vont avoir une activité à distance au niveau de la plante ; ils induisent une série de modifications chez celles-ci (Chataigné, 2007).

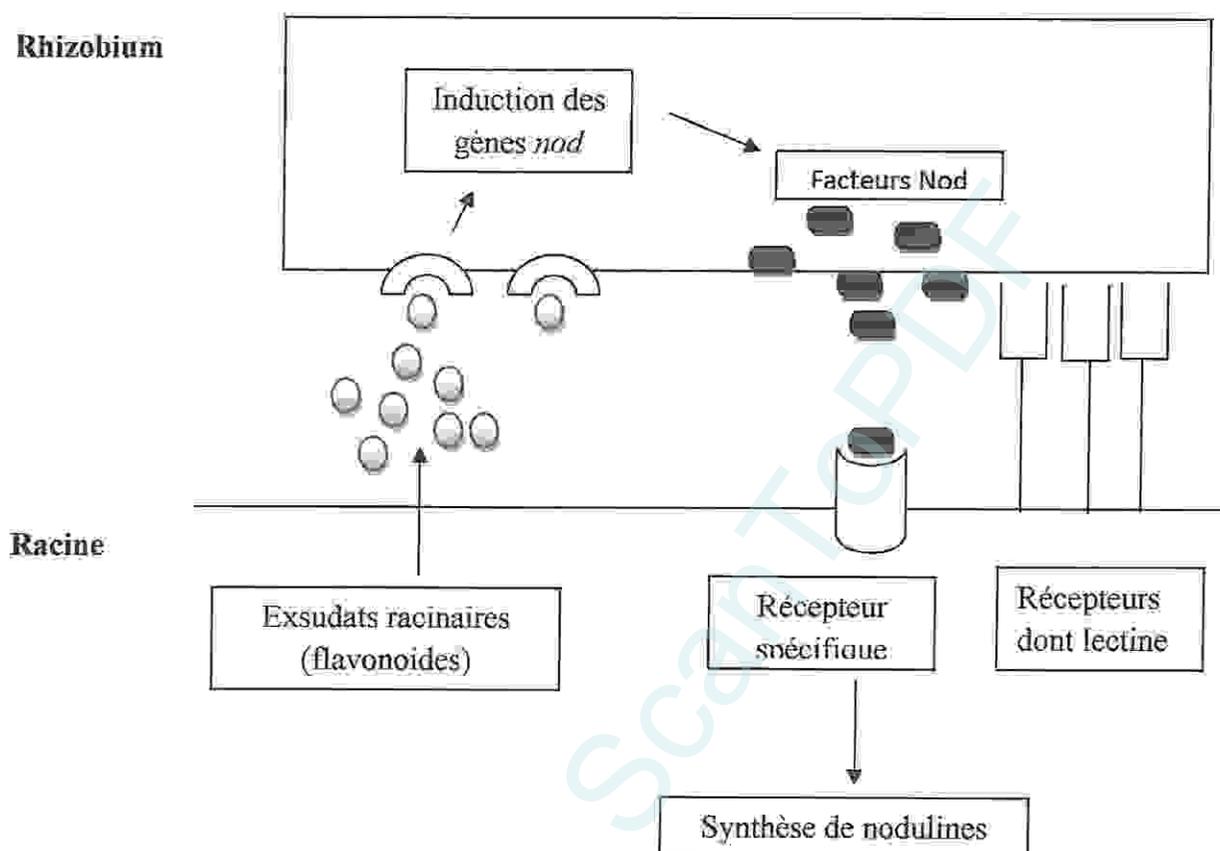


Figure 03 : Echanges de signaux chimiques entre rhizobium et racine de légumineuse (Pelmont, 1992).

II-3 Echanges entre les deux partenaires :

La symbiose rhizobium/légumineuse est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi au rhizobium pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. La plante fournit aux bactéries une niche dans laquelle elles peuvent se multiplier abondamment, et des composés carbonés issus de la photosynthèse (Gough, 2009), celles-ci captent l'azote de l'air et le donnent à son hôte (Raven *et al*, 2000).

Les bactéroïdes sont hétérotrophes pour le carbone. Le saccharose, apporté par le phloème est transformé par les cellules non infectées en diacide à quatre carbones qui alimentent le catabolisme des bactéroïdes des cellules infectées, et fournissent l'énergie et les électrons nécessaires à la réaction que catalyse la nitrogénase, et qui réduit l'azote atmosphérique en azote ammoniacal utilisable par les cellules (Selose, 2009).

La production de la nitrogénase est un facteur important dans l'efficacité de la fixation symbiotique de l'azote (Gage, 2004). Cette enzyme étant instable en présence d'oxygène

libre ; sa biosynthèse est d'ailleurs inhibée par l'oxygène. Dans les nodosités, la teneur en oxygène doit être à la fois compatible avec la respiration du bactéroïde et l'activité de la nitrogénase.

La leghémoglobine, protéine de coloration rouge (présence de fer) et présentant des similitudes avec les hémoglobines animales, permet aux *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule. Elle permet ainsi d'éviter l'inactivation de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène tout en assurant l'apport d'O₂ indispensable à ces bactéries aérobies (Selose, 2009). On a longtemps cru que cette protéine était synthétisée par la bactérie : mais maintenant, la biosynthèse par la plante a été démontrée. La leghémoglobine qui est donc un produit du végétal, est l'une des nombreuses protéines que la plante ne synthétise que dans la nodosité, en présence des bactéries, et qu'on surnomme collectivement les « noduline ». La fixation de l'azote est un processus riche d'énergie (Gage, 2004), les nodosités consomment de 15% à 30% des produits de la photosynthèse. Pour fabriquer 1 mg de matière sèche, une légumineuse doit fixer 810mg de carbone contre 510 mg pour une espèce sans nodosités ; la fixation d'un gramme d'azote « coute » 12 à 17 g de saccharose.

La protection contre l'oxygène et l'apport de l'énergie nécessaire à la fixation complètent donc la capacité des bactéries à produire la nitrogénase, illustrant bien la coopération entre les partenaires pour la réalisation d'une fonction commune. Les rhizobiacées libres dans le sol ne fixent en effet pratiquement jamais l'azote, faute de trouver ces conditions réunies (Selose, 2009).

III- Etablissement de symbiose rhizobienne

III-1 Familles des plantes hôtes

Les légumineuses (littéralement : légume dont le fruit est une gousse) représentent 1/12 des plantes à fleurs, soit plus de 18 000 espèces connues (Wahigora, 2008). Elles appartiennent à la famille de fabacées (terme utilisé dans le système de classification avant 1960). Cette famille comprend des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses ; elle colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre.

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer avec des bactéries de sol communément appelées *rhizobiums*.

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Cette fixation leur permet de produire en abondance des protéines végétales ce qui constitue une source très importante dans l'alimentation humaine et animale.

Les légumineuses sont cultivées aussi pour rompre les successions céréalières préjudiciables aux rendements et aux productions à travers les assolements (Masson et Gintzburger, 2000).

III-1-1 Légumineuse étudiée ** pois chiche**

Le *pois chiche* est probablement originaire du Proche-Orient (Sud-Est de la Turquie, Syrie) où trois espèces annuelles sauvages de pois chiches existent encore dans cette région.

Les pois chiches sont connus et mentionnés depuis l'Antiquité, sous le nom d'*halluru* (3 000 ans avant JC) comme source alimentaire en Mésopotamie. En langue arabe il est nommé *hulth*.

Le nom latin du genre pois chiche est *cicer* dérivé du grec antique *kickere* des populations du Nord de la Grèce. Cette racine se retrouve aujourd'hui dans le français *pois chiche*, dans l'italien *cece*, dans l'allemand *Kichererbse*, dans l'anglais *chickpea*, dans le néerlandais *kikkerwert* ou même dans le berbère *ikiker*. En revanche son nom espagnol *garbanzo* qui n'est ni d'origine arabe, ni d'origine latine, est peut-être l'indice d'une introduction encore plus ancienne.

Le nom spécifique *arietinum* fait référence à la forme de la graine en tête de bélier (*aries*) flanquée de ses cornes (site web n° 02) (Fig 04).



Figure 04: La plante de pois chiche (Site web n° 02).

III-2 Rhizobiums

III-2-1 Définition :

Les rhizobiums sont des microorganismes capables de provoquer la formation de nodosités fixatrices d'azote atmosphérique sur les racines de la famille de légumineuses. Certains rhizobiums sont capables de former des nodosités sur les tiges de certaines légumineuses (*Sesbania*) (Traore, 1991).

III-2-2 Taxonomie :

La taxonomie a pour but de rassembler des organismes partageant des caractéristiques communes en groupes ou taxons bien délimités. Les groupes sont définis selon trois études, l'identification, la nomenclature et la classification. La première nécessite l'isolement de la bactérie, sa caractérisation par des analyses phénotypiques et moléculaires universelles et la comparaison des caractères à ceux des bactéries connues. La deuxième consiste à donner un nom spécifique à la bactérie identifiée selon le Code International de Nomenclature Bactérienne, qui comporte le nom du genre et de l'espèce. Tout genre doit être représenté par une espèce type et toute espèce doit être représentée par une souche type (Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia et de Lajeudi, 2006).

La taxonomie des rhizobium a toujours subi des révisions et des changements avec le progrès et l'évolution des méthodes d'identification utilisées (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Tableau I : la classification des Rhizobiums. (El-Hilali, 2006)

Genres	Espèces	Plantes hôtes
<i>Allorhizobium</i>		
	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>		
	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>		
	<i>Br. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Br. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Br. liaoningensis</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>Br. Yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
	<i>Br. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>
	<i>Br. canariense</i>	-
<i>Mesorhizobium</i>		
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
	<i>M. sesquitrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>Rhizobium</i>		
	<i>R. leguminosarum</i>	
	biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, viciae, Lens, Lathyrus</i>
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>

<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
biovar <i>officinalis</i>	
biovar <i>orientalis</i>	
<i>R. tropici</i> type IIA et IIB	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium, etc.,</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
biovar <i>phaseoli</i>	
biovar <i>gallicum</i>	
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
biovar <i>phaseoli</i>	
biovar <i>giardinii</i>	
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huatlungense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>S. fredii</i>	
biovar <i>fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
biovar <i>siensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>S. saheli</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>S. terangae</i>	
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i>
biovar <i>sesbania</i>	<i>Sesbania</i>

<i>S. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>S. xingianense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowiae stipulaceae</i>
<i>S. americanum</i>	<i>Acacia</i>

Produced with ScanTOPDF

III-2-3 Caractères généraux :

Les différents caractères des Rhizobiums sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau II : Caractères des Rhizobiums

Caractères	Particularité
Caractères morphologiques	Forme : Bâtonnets, Gram négatif, non sporulants Mobilité : mobile (la forme végétative) (Gharzouli, 2006)
Caractères culturaux	Croissance rapide de 2 à 3 jours Croissance lente de 3 à 5 jours (<i>Bradyrhizobium</i>) Sur milieu YMA, des colonies circulaires, blanches, opaques ou laiteuses, translucide parfois brillantes (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970)
Caractères biochimiques	Chimio- organotrophe (Torche, 2006). Les rhizobiums à croissance rapide croissent dans le glucose, mannitol ou saccharose. Les rhizobiums à croissance lente préfèrent le pentose (Gharzouli, 2006).
Caractères physiologiques	Aérobic ou aérophile (Gharzouli, 2006). La température optimale de croissance est entre 25 et 30°C. Le pH optimum est de 6.8-7 avec une tolérance identique à l'alcalinité et différente à l'acidité (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Beck <i>et al.</i> , 1993).
Caractères génétiques	ADN génomique caractérisé par des séquences répétitives (Laranjo <i>et al.</i> , 2002 ; Gharzouli, 2006) ADN plasmidique comporte les gènes symbiotiques, les gènes de nodulation et les gènes de fixation de l'azote (Silva <i>et al.</i> , 2003).

III-3 Nodulation

III-3-1 Processus de nodulation :

Certaines conditions requises avant la mise en place de la symbiose, à savoir une faible teneur en azote du sol et une photosynthèse active pour assurer une source suffisante d'énergie (Kondorosi et Kondorosi, 2000) (Fig 05).

Le développement du nodule est un processus complexe impliquant la différenciation de plusieurs types de cellules spécialisées comme résultat d'une série d'échanges de signaux entre la plante et les partenaires microbiens. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan et Martink, 2007). Les étapes sont :

III-3-1-1 Pré-échange de signal d'infection :

L'étape de rencontre entre la plante et la bactérie s'effectue au niveau de la rhizosphère (Savka *et al.*, 2002).

L'interaction entre ces deux partenaires se fait par l'intermédiaire des signaux chimiques (site web n° 03). En condition de carence azoté, le plante produit des flavonoïdes (molécules signal) au niveau de leur racine, une fois ce signal est perçu par les rhizobiums il induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteur Nod (Dénarié, 2000).

L'invasion et la formation des nodules sont le résultat d'un échange de signaux chimiques (Pelmont, 1995) qui est programmé par la plante et déclenché par les bactéries (site web n° 03)

III-3-1-2 Reconnaissance et attachement :

Les bactéries s'attachent aux racines de la plante par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisé à la surface de cellules (la rhicadhésine) (Perry *et al.*, 2004), qui est une protéine affine pour le calcium et opère en se fixant sur des complexes calcique à la surface de poils absorbants. (Brewin *et al.*, 1992 ; Madigan et Martink, 2007).

Des lectines qui sont des glycoprotéines végétales, ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales sont également impliquées dans l'adhésion. Ces récepteurs ont la particularité de reconnaître et de se lier spécifiquement avec

différents glucides, elles paraissent et reconnaissent des polysaccharides complexes localisé à la surface des bactéries (Hopkins, 2003).

III-3-1-3 La formation de nodulines précoce :

Les bactéries migrent vers l'extrémité de poils absorbant, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérelliques et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupux et Nougier, 2005) et provoquent l'incurvation de l'extrémité des poils absorbants en crochet caractéristique ainsi que la formation de pré nodules par stimulation de la mitose des cellules corticales. A ce stade un deuxième message est envoyé aux racines des légumineuses et deux solutions se présentent :

**soit des racines reconnaissent le message, se modifient et provoquent une stimulation de la croissance : nodules fonctionnelles.

**soit rien ne se passe, les pré nodules restent non fonctionnel (site web n° 03).

III 3 1 4 Recourbement des poils absorbants et la formation de cordon d'infection :

Lors de ce stade de la nodulation, la bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemma (Hopkin, 2003).

L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine. Dès la reconnaissance du *Rhizobium* spécifique, des modifications structurales apparaissent dans les toutes premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologiques du poil absorbant : dépolarisations membranaires, modification de concentrations du Ca^{2+} intracellulaire, augmentation de pH et fragmentation de l'actine (Duhoux et Nicole, 2004).

Les cellules de *Rhizobium* sont piégées dans une poche formée par la paroi des crochets. La membrane plasmique forme une invagination dans laquelle pénètrent des bactéries. Simultanément, la plante sécrète une gaine cellulosique autour des bactéries et forment ainsi un canal infectieux qui se dirige vers un pré-nodule. Les LPS (lipopolysaccharides) de *Rhizobium* joueraient un rôle lors de la formation du canal. Celui-ci libère finalement les bactéries dans le cytoplasme des cellules corticales. Celles-ci se divisent alors pour constituer une nodosité vascularisée dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes en endosymbiose. Ces derniers, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod. En

revanche, les bactéroïdes se concentrent dans la production de nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote moléculaire (site web n° 03).

III-3-1-5 Développement du nodule et libération des bactéries

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte. Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote, nommées bactéroïdes. Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane, nommée membrane pér bactéroidienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses modifications métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale: la fixation d'azote (Hopkin, 2003).

L'endocytose est probablement la conséquence d'interactions physiques entre lipopolysaccharides sur la surface des bactéries et des composés glycoprotéiques et glycolipidiques sur la surface de la membrane cellulaire de la plante. La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et des cellules corticales de la racine produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosité (Davet, 1996 ; Raven *et al.*, 2000).

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux et Nicole, 2004).

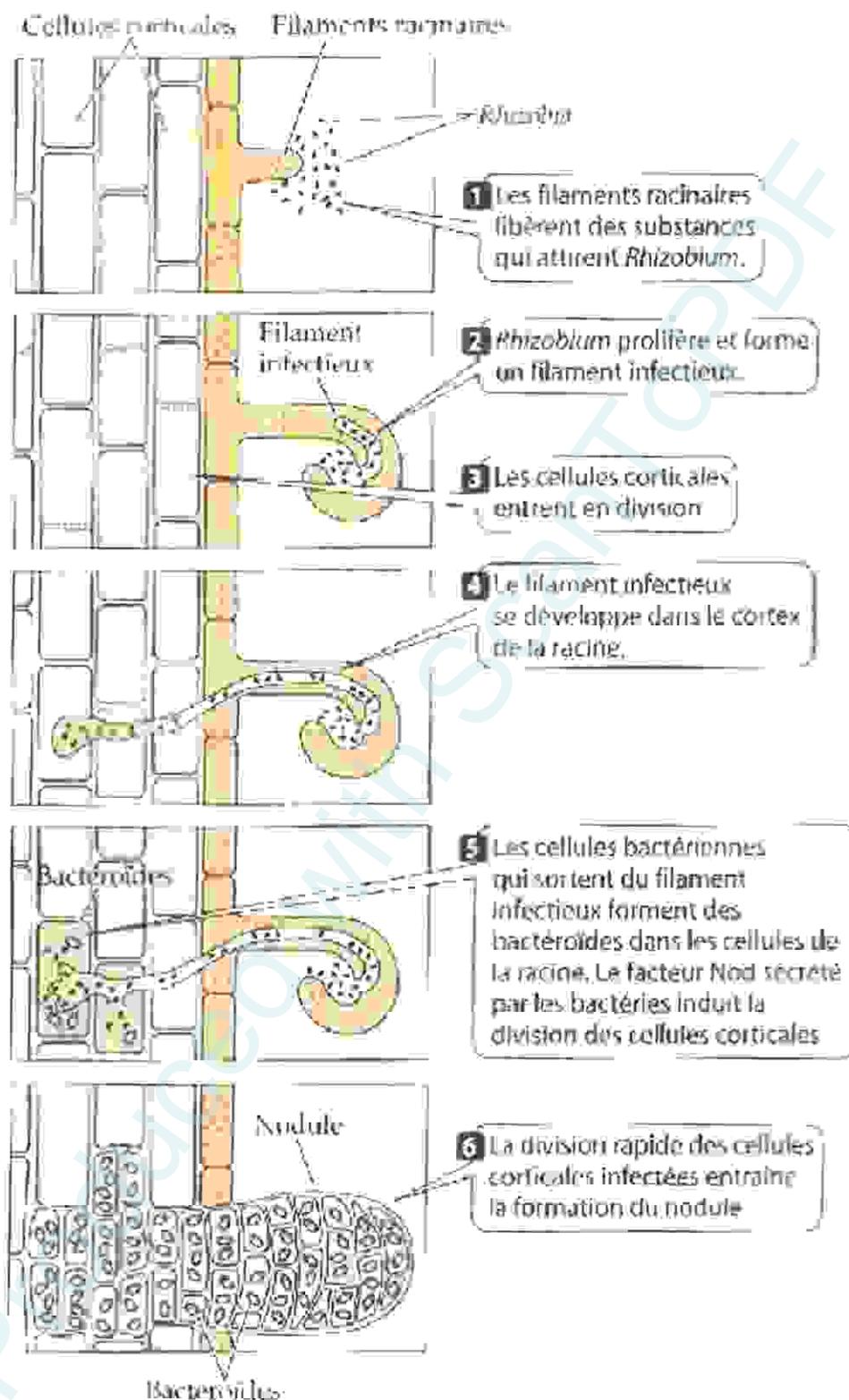


Figure 05 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004).

III-4 La structure morphologique des nodules

Les nodosités (encore appelées « nodules », mais c'est un anglicisme) sont des petites boules rosâtres de 1 à 10 mm, situées latéralement à la surface de la racine. Généralement souterraines, les nodosités apparaissent dans de rares cas sur la tige, comme chez la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata*.

En coupe, la nodosité montre un cortex subérifié et épais, des faisceaux cribro-vasculaires périphériques et une zone médullaire rosâtre où l'on distingue au moins quatre zones (Fig 06).

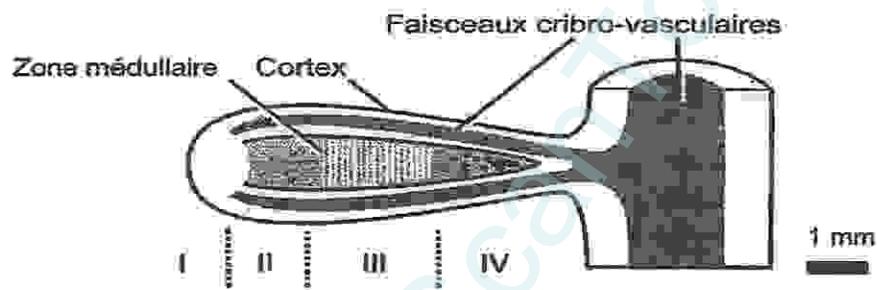


Figure 06 : Coupe d'une nodosité (Selose, 2009).

En microscopie électronique, la zone I montre de nombreuses mitoses : c'est une zone méristématique, dépourvue de bactéroïdes. Les cellules de la zone II acquièrent progressivement des bactéroïdes : c'est une zone d'infection, où les cellules se différencient en augmentant leur volume et en se polyploïdisant (réplications multiples de l'ADN, sans division cellulaire). Les cellules de la zone III, zone physiologiquement active, apparaissent colonisées par de nombreux corps, les bactéroïdes, limités par leur propre enveloppe et par une membrane supplémentaire, dite membrane pér bactéroïde ou membrane de séquestration. Les cellules infectées (bactéroïdes) meurent ensuite dans la zone IV ; c'est la zone de sénescence de la nodosité (Selose, 2009).

III-5 La génétique de la nodulation

III-5-1 Chez les rhizobiums

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de rhizobiums et dans le chromosome des souches de bradyrhizobiums (Raven *et al.*, 2000). De nombreux gènes bactériens interviennent dans la

nodulation de la plante (gènes *nod*) et dans le fonctionnement du nodulé avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes *nif* et *fix*) (Werner, 1992). Les gènes *nod* sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes *nif* et les gènes *fix* sont regroupés dans 5 régions distinctes.

III-5-1-1 Les gènes *nod*

Les gènes *nod* sont les gènes de symbiose les plus spécifiques pour le microsymbiont, permettant la communication avec la plante hôte pour former les nodules.

* Les gènes *nod D*

Les gènes *nod D* ont été suggérés jouer un rôle dans la spécificité de l'hôte. Il existe 3 copies des gènes *nod D* (*nod D1*, *nod D2*, *nod D3*) ce qui constitue un avantage pour l'augmentation de l'interaction avec la plante hôte (Lucinda et Sharon, 1998).

Les gènes *nod D* sont activés par des différents flavonoïdes et flavones, les protéines Nod D activent l'expression des gènes de nodulation du *Rhizobium*, en se fixant sur leurs promoteurs spécifique appelé "nod box" (Pelmont, 1995 ; Debelle *et al.*, 2001).

*Les gènes *nod ABC*

Appelés aussi les gènes communs présents chez tous les rhizobia, sont des gènes interchangeable, nécessaires pour la formation du "curling" et pour déclencher une série de divisions des cellules végétales (Sharma *et al.*, 1993 ; Gage, 2004).

Des mutations au niveau de ces gènes codant au phénotype *nod-* (les bactéries n'arrivent pas à déclencher la formation d'un nodule) (Sharma *et al.*, 1993).

**NodC* code pour une protéine qui s'incorpore sur la membrane de la surface bactérienne et peut intervenir dans le déplacement de la bactérie vers la plante.

**NodA* et *nodB* peuvent produire des composants à faible poids moléculaire favorisant la croissance des plantes, en stimulant la division cellulaire (Richter, 1993 ; Trevaskis *et al.*, 2002).

*Les gènes *nod O*

Le gène *nod O* n'est pas localisé sur le plasmide Sym, il code pour une protéine sécrétée par la souche de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* qui joue un rôle dans la signalisation durant la nodulation des légumineuses et la détermination de la spécificité de l'hôte. Elle est également essentielle pour la synthèse d'autres facteurs de nodulation (Werner, 1992 ; Finnle *et al.*, 1997 ; Gage, 2004).

III-5-1-2 Les gènes *nif*

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse du complexe enzymatique nitrogénase.

Les gènes *nifHDK* qui codent les composants de cette enzyme sont présents chez tous les fixateurs d'azote examinés à ce jour.

Les gènes *nif*, *nifD* et *nifK*, codent pour les deux sous-unités de la protéine MoFe. La protéine Fe est codée par le gène *nifH*.

D'autres gènes *nif* sont impliqués dans l'activation et l'assemblage du complexe enzymatique (Hopkins, 2003 ; Pelmont, 1995).

La régulation de l'expression de la nitrogénase fait intervenir au niveau transcriptionnel d'autres gènes *nif* de l'opéron (*nifA* et *nifL*) (Saoudi, 2008).

III-5-1-3 Les gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et sont impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Hopkins, 2003). Les gènes *fixNOQP* codent pour un cytochrome oxydase, *fixGHIS* code pour la pompe cationique, *fixABCX* code pour une flavoprotéine, qui sont tous nécessaires pour la fixation de l'azote. Dans l'environnement des nodules racinaires, l'oxydase offre l'énergie nécessaire, alors que la flavoprotéine dirige le flux d'électrons à l'oxydase (Crossman, 2004).

III-5-2 Chez la plante

Chez la plante des gènes spécifiques codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005). Ces nodulines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins, 2003).

III-6 Facteurs influençant la nodulation

Les bactéries du genre *Rhizobium* montrent, en général, une faible persistance dans les sols, ce qui peut entraîner une nodulation insatisfaisante des légumineuses et une réduction conséquente de leur productivité (Evans *et al.*, 1993 b). Le facteur susceptible d'entraver la

fixation d'azote n'est généralement pas l'absence de souches bactériennes efficaces, mais un ou plusieurs facteurs écologiques qui en limitent les potentialités (Alexander, 1985).

Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont la sécheresse, la salinité, les hautes températures, les pH extrêmes acides ou alcalins et les carences en éléments nutritifs (Henzell, 1988). Aux facteurs abiotiques, il faut encore ajouter les facteurs biotiques négatifs comme la compétition, la prédation, etc.

Les divers stress biotiques et abiotiques peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia à l'état saprophytique (en absence de la plante hôte). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose (Hirsch, 1996).

III-6-1 Contraintes abiotiques

Le potentiel hydrique du sol peut influencer la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia et, dans des conditions de sécheresse élevée, la nodulation peut être faible et/ou inefficace. La sécheresse peut aussi influencer la survie des rhizobia pendant leur vie saprophytique (Chao et Alexander, 1982). En outre, l'aridité peut inhiber la fixation d'azote, la nitrification étant très sensible à des variations, même faibles, du potentiel osmotique du sol (Sinclair *et al.*, 1987).

La tolérance au stress salin est une propriété très importante pour la survie au stade saprophytique et la compétitivité des rhizobia, et ainsi pour leur relation symbiotique avec les légumineuses. L'initiation nodulaire est extrêmement sensible au NaCl par réduction des sites d'infection de la racine, du nombre des poils radiculaires et de la proportion de ceux qui portent les cordons d'infection.

Les sols salins, qui se forment en général dans des conditions d'aridité élevée et de hautes températures, sont souvent alcalins et peuvent présenter une disponibilité réduite en phosphore, fer, zinc et manganèse (Eisheikh et Wood, 1989 a). Toutefois, le stress hydrique étant en général de durée limitée, il suffit que les micro-organismes puissent y survivre un certain laps de temps. Le stress salin est lui permanent et les micro-organismes doivent s'y adapter afin non seulement de survivre mais aussi de se reproduire (Sprent, 1984 ; Zaharan, 1991).

Ainsi, l'acidité du milieu modifie le nombre de nodules, une faible baisse pouvant le réduire fortement. De nombreux chercheurs ont montrés que le chaulage améliore la nodulation (Wey et Obaton, 1978 ; Singh *et al.*, 1985). Il apparaît que l'influence du pH sur la nodosité et l'activité des rhizobiums est différente selon le climat. Dans les zones tempérées, la croissance et la nodulation des légumineuses est plus active sur sols neutres ou légèrement acides. Tandis que l'optimum de croissance des légumineuses tropicales est compris entre 5 et 6,5. De plus, dans ces zones les rhizobia résistent mieux à l'acidité et sont capables de fixer l'azote à pH 4,5. Toutefois il y a toujours une baisse de la nodosité sur sol acides, comme ceux riches en aluminium (Maougol, 2004).

En outre, une interaction entre salinité, pH et températures élevées peut avoir des effets plus néfastes sur la symbiose que chacun de ces facteurs pris séparément (Elsheikh et Wood, 1989 a).

III-6-2 Contraintes biotiques

Pour qu'une implantation réussisse, il importe que les bactéries inoculées survivent dans le nouvel environnement. Il est toutefois difficile, du fait de la grande hétérogénéité du milieu qui peut empêcher les bactéries d'atteindre et d'occuper les microhabitats les plus propices à leur survie (Postma *et al.*, 1989), de prévoir le taux de survie des souches introduites dans un sol.

Les différentes souches de rhizobia coexistant simultanément dans un sol présentent des différences de capacité à rivaliser pour l'occupation des nodules, et le succès dans la symbiose est influencé par les facteurs environnementaux, la plante hôte, la taille initiale de la population de rhizobia et sa répartition dans le sol (Heljnen et Van Veen, 1991 ; Postma *et al.*, 1989).

À ces contraintes, il faut ajouter la prédation, surtout par les protozoaires, qui est souvent responsable du déclin des rhizobia, après leur introduction dans le sol (Habte et Alexander, 1977).

Les autres facteurs biotiques qui peuvent réduire le nombre des rhizobia incluent les bactériophages, les parasites (Keya et Alexander, 1975), les antibiotiques produits par d'autres micro-organismes et les bactériocines produites par d'autres rhizobia (Hirsch, 1979).

Une résistance intrinsèque aux antibiotiques peut donc être importante, du point de vue écologique, pour les micro-organismes du sol, en raison d'une compétitivité plus élevée et d'une plus grande aptitude à survivre, principalement dans les sites arides où la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques (Cacciari *et al.*, 2003).

Pour qu'une bactérie puisse coloniser une racine, elle doit posséder un ensemble de traits physiologiques caractéristiques (Weller, 1988 ; Hozore et Alexander, 1991) et manifester un large spectre de tolérance aux contraintes abiotiques et biotiques (Alexander, 1971).

L'étude de la physiologie des rhizobia face aux contraintes environnementales peut apporter des indications utiles pour une meilleure compréhension des stratégies qu'elles adoptent pour résister aux conditions de privation de nutriments et être capables, les conditions redevenant favorables, de reprendre une activité et d'atteindre les sites de nodulation (Cacciari *et al.*, 2003).

IV- Transformation génétique

IV-1 Transformation naturelle :

IV-1-1 Définition

La transformation "naturelle" ou physiologique est le premier modèle connu de transfert de matériel génétique (site web n° 04). Ce transfert se fait d'une bactérie donatrice de matériel génétique (exogénote) à une bactérie réceptrice dont le génome constitue l'endogénote. La bactérie réceptrice peut acquérir des caractères nouveaux ce qui suppose que l'exogénote soit exprimé par la bactérie réceptrice et qu'il soit transmis à la descendance (site web n° 05). Pour être transformant l'ADN doit être bicaténaire et d'un poids moléculaire suffisant (> 5-10 MDa). L'origine de l'ADN n'a aucune importance : il peut provenir ou non de la même espèce bactérienne ou même d'un eucaryote et être de nature chromosomique, plasmidique ou phagique.

Pour être transformables, les bactéries doivent être en état de compétence (site web n° 06).

****Compétence**

Dans les conditions qui favorisent la transformation, certaines bactérie deviennent donneuses de matériel génétique et libèrent de l'ADN dans le milieu par autolyse (ou peut être par sécrétion) alors que d'autres cellules (réceptrices) internalisent cet ADN (Raymond, 1993).

IV-1-2 Mécanisme :**IV-1-2-1 Chez les bactéries à Gram positif :**

Les principales étapes de la transformation ont été surtout étudiées chez les bactéries à gram positif, notamment *Bacillus subtilis* qui est le modèle le plus étudié. (Fig 19)

Chez celle ci, les différentes phases mettent en jeu un activateur spécifique d'espèce, excrété par la bactérie et qui se fixe à la surface de la bactérie (site web n° 07).

- Une cellule compétente lie un fragment d'ADN double brin de taille moyen, le processus se fait au hasard puisque tous les fragments du donneur sont en compétition entre eux. La capture de l'ADN demande de l'énergie.
- L'ADN est ensuite clivé par une endonucléase en fragments doubles brins d'environ 15 kilobases.
- L'exonucléase dégrade l'un des deux brins d'ADN alors que le deuxième brin pénètre dans le cytoplasme.

L'ADN peut alors être dégradé par les enzymes cellulaires ou, s'il est très proche de l'ADN chromosomique, il peut être utilisé par les enzymes de réparation de l'ADN pour être recombinaison avec le chromosome (Prescott *et al.*, 2003). (Fig 07)

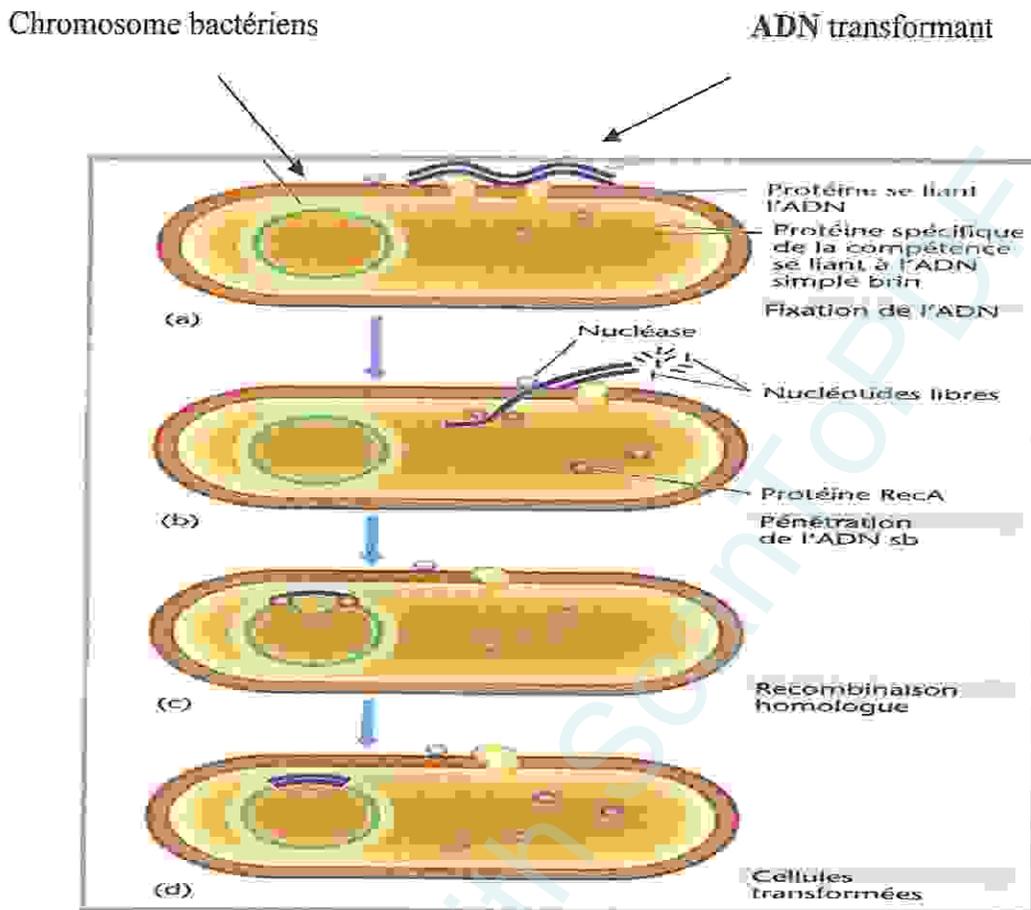


Figure 07 : Mécanisme de la transformation naturelle chez une bactérie Gram positif (Mardigan et Martink, 2007).

IV-1-2-2 Chez les bactéries à Gram négatif :

Les mécanismes sont proches, mais il existe deux différences essentielles :

*L'état de compétence et la capture de l'ADN sont associés à la présence de petites vésicules membranaires, appelées transformasomes, et qui font saillie à l'extérieur de la cellule. L'ADN transformant est capturé par ces vésicules et il est transporté dans l'espace périplasmique dans lequel il est dégradé et un unique brin d'ADN gagne le cytoplasme avant d'être incorporé au chromosome. (Fig 08)

*La capture de l'ADN exogène nécessite la reconnaissance de séquences spécifiques de 10 à 11 Pb. Par exemple, la séquence AAGTGCGGTCA pour *Haemophilus influenzae* ou la séquence GCCGTCTCAA pour *Neisseria gonorrhoeae*. Des séquences d'une telle longueur

ont peu de chance d'être présentes sur de nombreuses molécules d'ADN cela veut dire que seul des ADN spécifiques peuvent être transformant (site web n° 05).

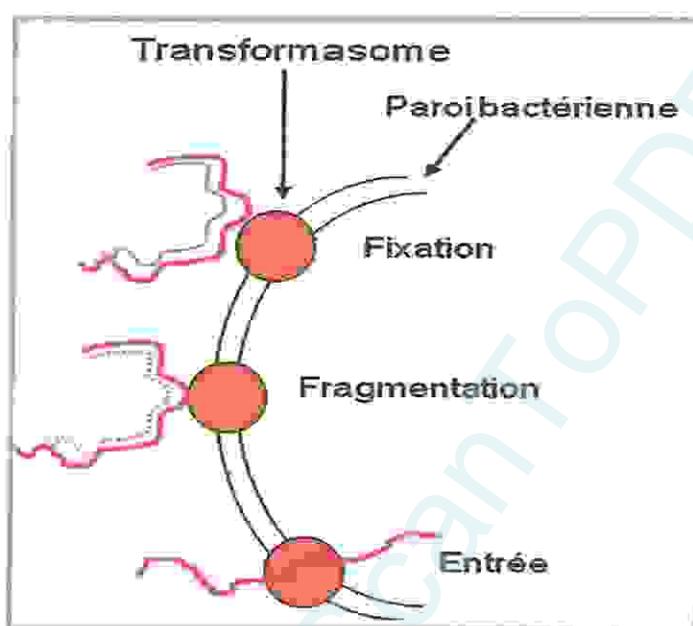


Figure 08 : Mécanisme de la transformation naturelle chez une bactérie Gram négatif (Site web n° 05).

IV-2 Transformation artificielle

La transformation artificielle est une technique de biologie moléculaire destinée à transférer diverses molécules d'ADN à des bactéries non naturellement transformables (site web n° 06). Elle est devenue aujourd'hui une pratique courante de laboratoire ; pratiquement tous les domaines de la recherche en biologie font désormais appel à cette technique.

Les bactéries se prêtent particulièrement aux expériences de transformation car il est techniquement facile de leur faire intégrer des molécules d'ADN étrangères (site web n° 08). Pour rendre compétente la bactérie réceptrice, différentes techniques sont utilisées, reposant sur une désorganisation de la paroi qui permet le passage de l'ADN (site web n° 07).

Une des méthodes les plus courantes, consiste à concentrer les cellules en phase exponentielle dans une solution de chlorure de calcium (Raymond, 1993) et à soumettre le mélange à un choc thermique (chauffage à 42 °C suivi d'un refroidissement brutal dans la glace) (site web n° 06). Le rôle exact du calcium dans l'établissement de cette compétence

n'est pas encore élucidé : il pourrait neutraliser ou éliminer des molécules présentes à la surface des cellules et qui bloqueraient la pénétration de l'ADN. Le calcium pourrait aussi se lier à l'ADN et le faire précipiter à la surface des cellules sous une forme propice à l'internalisation. Il pourrait activer un système enzymatique impliqué dans la prise de l'ADN ou encore agir par quelque combinaison des effets précités.

Une autre technique de plus en plus rependue consiste à faire pénétrer l'ADN par électroporation. Quand des cellules fragilisées sont soumises à un choc électrique à haute tension, elles puisent l'ADN exogène, apparemment à travers des pores créés dans la membrane cytoplasmique.

Des cellules bactériennes dont la paroi de peptidoglycane est éliminée (protoplastes), peuvent aussi être transformées par des liposomes. L'ADN en solution forme spontanément des complexes avec des liposomes préparés à partir d'un lipide cationique. Les liposomes se lient aux protoplastes et font pénétrer l'ADN, probablement par fusion avec la membrane cytoplasmique (Raymond, 1993)

Chapitre II

Matériel et méthodes

Produced with ScanTOPDF

I-Matériel et méthodes

Les trois bactéries qui ont fait l'objet de ce travail nous ont été gracieusement fournies par Mme Bouabid. Ces dernières ont été choisies en fonction de leurs infectivités (le nombre de nodules qu'elles induisent).

La première souche (souche 03) est la plus infective en induisant 37 nodules, la deuxième souche (souche 06) a induit 22 nodules et la troisième souche (souche 09), est la moins infective elle n'a induit que 3 nodules.

Avant d'entamer les travaux d'extraction et de transformation, il est nécessaire de réactiver les bactéries et de vérifier leurs morphologies.

I-1 Etude de l'aspect morphologique

I-1-1 Ensemencement sur milieu de culture :

- Faire fondre le milieu YMA additionné de Rouge Congo.
- Couler le milieu dans des boîtes de Pétri.
- Laisser solidifier, puis préparer les suspensions bactériennes
- Ensemencer par des stries selon la méthode de quatre cadrans chaque souche.
- Incuber à 28°C pendant 24 heures (Vincent, 1970).

I-1-2 Examens microscopiques :

I-1-2-1 Coloration de Gram :

Cette étape permet de connaître l'appartenance des bactéries au (Gram négatif ou positif) elle permet également d'observer la forme et la taille des bactéries.

Après fixation des bactéries sur une lame propre par la flamme du bec, les étapes de la coloration sont les suivantes :

- Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute.
- Ajouter le Lugol et laisser agir pendant 1 minute.

- Laver à l'eau puis à l'alcool pendant 30 secondes, puis un autre rinçage avec l'eau distillée.
- Recolorer avec la Fuchsine et laisser agir pendant une minute.
- Rincer à l'eau distillée et sécher la lame.
- Observer au microscope avec l'objectif 100x.

I-2 Conservation des isolats

La technique de conservation utilisée est celle décrite par Vincent (1970). Le milieu YMA est réparti sous forme inclinée dans des tubes à essai.

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 28°C pendant 24 heures, les tubes sont conservés à 4°C.

Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

I-3 Extraction de l'ADN plasmidique à partir des souches conservées

L'extraction de l'ADN plasmidique est une technique permettant d'isoler les plasmides de cellules. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que la transformation. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe.

Chacune des trois souches est ensemencée dans 20 ml du milieu YMB et est incubée pendant une nuit dans un bain marie avec agitation à 28°C.

A partir de cette culture ; nous avons effectué une extraction de l'ADN plasmidique, en utilisant la technique de la lyse alcaline. Cette méthode permet de récupérer facilement et rapidement une grande quantité d'ADN plasmidique plus ou moins pur, c'est-à-dire peu contaminé par de l'ADN génomique, des protéines ou d'autres composants bactériens. (Birnboim et Doly, 1979)

L'ADN issu des différents traitements sera finalement soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose.

- 1- Mettre une quantité de 1.5 ml de chaque suspension bactérienne dans un tube à Eppendorf.
- 2- Réaliser une centrifugation à 12000 tour/min pendant 5 minutes et éliminer le surnageant.
- 3- Recharger chaque tube avec 1.5 ml de la suspension bactérienne et renouveler l'opération.
- 4- Mettre le culot en suspension dans 10 μ l de tampon Tris-HCl 25 Mm pH 8 ; EDTA 10mM.
- 5- Ajouter 200 μ l de SDS 1% ; NaOH 0.2M.
Mélanger au vortex à faible vitesse, jusqu'à obtenir une suspension claire et légèrement visqueuse.
- 6- Récupérer le culot et le suspendre dans 150 μ l d'acétate de sodium 3M, pH 5,2.
- 7- Centrifuger, récupérer le culot et laisser sécher.
- 8- Ajouter 1 ml d'éthanol froid.



I-4-2 Préparation des échantillons à analyser :

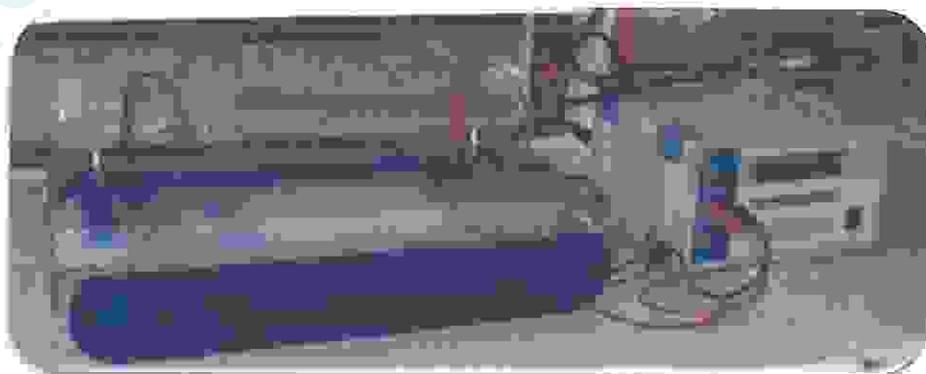
- Pour chaque échantillon, mélanger dans un tube Eppendorf 10 μ l de l'échantillon d'ADN à analyser avec 10 μ l d'eau distillé et 10 μ l de colorant de charge (bleu de bromophénol).

**I-4-3 Dépôt :**

- Les échantillons sont déposés à l'aide des micropipettes dans les puits.
- Brancher les câbles de la cuve au générateur de manière à ce que les dépôts soient du côté cathode (-).

**I-4-4 Migration :**

- La migration de l'ADN est faite de la cathode vers l'anode sous un champ électrique de 100V.
- Arrêter la migration lorsque le bleu atteint l'autre extrémité du gel.



I-4-5 L'observation :

- L'observation des bandes est obtenue sous une lampe à UV à 254 nm.

I-5 Transformation bactérienne

La transformation a été effectuée selon la méthode décrite par Birnboim H. et Doly S. en 1979.

I-5-1 Préparation des bactéries compétentes :

Une préculture des souches réceptrices « souche 09 » dans le milieu YMB est obtenue après incubation à 28°C pendant une nuit sous agitation.

-Relancer une culture fraîche au 1/20 à 28°C sous agitation pendant 2 heures pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance.

-Centrifuger à 6000 t/min pendant 5min.

-Reprendre le culot par 1ml de CaCl₂ 0,1M froid.

-Réaliser une deuxième centrifugation à 6000t/min pendant 5min.

-Ajouter 1ml de CaCl₂ au culot et laisser le mélange 20 min à 4° C.

-Réaliser une troisième centrifugation à 6000 t/min pendant 5min.

-Reprendre le culot dans 50 µl de CaCl₂ froid.

I-5-2 Transformation bactérienne :

- Mettre dans un Eppendorff 10 µl d'ADN et 20 µl des cellules compétentes.
- Mettre l'Eppendorff à 28°C pendant 1min puis 1heure dans la glace.
- Ajouter 1ml du milieu YMB frais et incubé sous agitation pendant une heure à 28°C.

I-6 Etude de l'effet de la transformation

Après la transformation, on passe à la vérification de la possible acquisition de certains caractères par la bactérie réceptrice et ceci par :

- * Etude de l'aspect morphologique
- * Etude de quelques caractères biochimiques.
- * Etude de la tolérance aux contraintes abiotique.
- * Etude du pouvoir de nodulation.

I-6-1 Etude de l'aspect morphologique :**I-6-1-1 Caractères cultureux :**

Les deux bactéries transformées (souche 09 transformée par l'ADN plasmidique extrait de la souche 06 et 09 transformée par 03) sontensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA additionné de rouge Congo.

I-6-1-2 Examen microscopique :**Coloration à la fushine**

La forme des deux souches transformées a été vérifiée par une coloration à la fushine.

***** Les étapes de la coloration :**

- A l'aide d'une anse de platine, prélever une partie de la colonie cible.
- Sur une lame contenant une goutte d'eau distillée stérile, mettre l'anse de platine sur la goutte d'eau et avec un mouvement de vas et vient, étaler le frottis sur la lame.
- Fixer le frottis par passage de la lame dans la flamme du bec Bunsen.
- Couvrir la lame par la fuschine et laisser agir pendant une minute.

- Rincer à l'eau et sécher la lame puis observer au microscope à l'objectif à immersion.

I-6-2 Etude de quelques caractères biochimiques :

Ces critères ont été vérifiées pour l'ensemble des souches ; les trois souches sauvages et les deux souches transformées.

I-6-2-1 Recherche de la catalase :

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



Déposer dans une boîte de pétri propre, une goutte d'eau oxygénée, puis la mettre en contact avec une goutte de suspension bactérienne.

Une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat de bulles gazeuses.

I-6-2-2 Recherche de l'oxydase :

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

Déposer sur une lame propre les disques d'oxydase, imbibés avec une goutte d'eau distillée ou eau physiologique stérile.

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

Une réaction positive se manifeste par un changement de la couleur de disque vers le mauve foncée.

I-6-3 Étude de la tolérance aux contraintes abiotiques :

Les critères physiologiques sont étudiés chez les trois souches sauvages ainsi que chez les deux souches issues de la transformation.

I-6-3-1 Tolérance à la température :

Le test a été réalisé sur le milieu YMA additionné de Rouge Congo à pH 6,8 : en incubant les souches aux températures : 5°C, 20°C, 37°C et 45°C. La lecture est faite après 24h à 48h d'incubation.

I-6-3-2 Tolérance au pH :

Le pH du milieu YMB est ajusté aux valeurs : 1, 3, 5, 8 et 12. La lecture est faite après 24h d'incubation à 28°C dans un bain marie avec agitation.

I-7-3-3 Tolérance à la salinité :

L'étude de la tolérance des souches à la salinité a été réalisée sur le milieu YMB à pH 6,8. Les souches ont été incubées à différentes concentrations en NaCl : 2, 5, 8 et 11%. La lecture a été faite après 24h d'incubation à 28°C dans un bain marie à agitation.

I-6-3-4 Tolérance aux métaux lourds :

Le test est conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à différents types de métaux lourds : Pb 250 µg/ml ; Al 250 µg/ml ; Co 25 µg/ml et Fe 250µg/ml (Graham, 1992)

Ces différents métaux sont ajoutés séparément au milieu YMB. Les tubes sont incubés sous agitation à 28°C pendant 24h.

I-7 Authentification des bactéries « Test de nodulation »

Le test de nodulation est une première approche pour identifier les souches, il permet d'évaluer la capacité et l'aptitude à former des nodules sur les racines de la plante hôte, dans des conditions bactériologiquement contrôlées. (Vincent ; 1970, Beck *et al.*, 1993).

Ce test consiste en l'inoculation des graines de la plante hôte (pois chiche) avec les différentes souches. Ici les trois souches sauvages et les deux souches obtenues après transformation.

I-7-1 Stérilisation du sol :

Le sol utilisé pour la réalisation de ce test provient du terrain de l'ITGC. Il est stérilisé au four Pasteur à 120°C pendant 20 min, 3 fois espacées de 24 heures avant de remplir les pots.

I-7-2 Préparation des pots :

Les pots utilisés sont en plastique désinfectés par l'eau de javel suivi d'un rinçage à l'eau distillée, ensuite ces pots sont troués à la base, et recouverts de papier aluminium (Fig 09).

Après stérilisation du sol, les pots sont remplis d'une couche de gravier qui a été déposée au fond et du sol stérile (Date et Halliday, 1987).

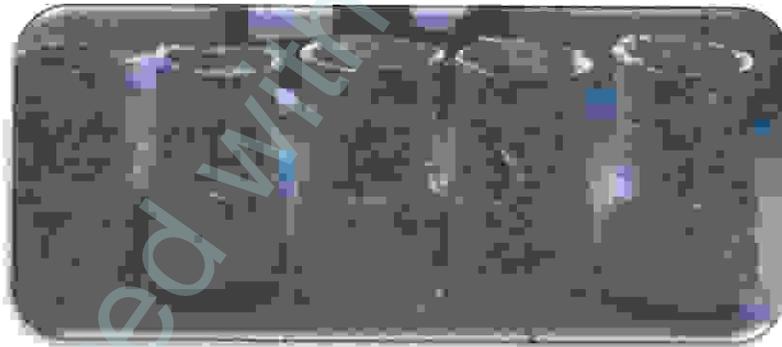


Figure 09 : Préparation des pots.

I-7-3 Germination des graines :

Les graines de pois chiche (*cicer arietinum* L.) sont sélectionnées selon une taille identique. Ces graines sont placées dans des tubes stériles et sont stérilisées à l'éthanol 95% (5 à 10 secondes), puis rincées 10 fois à l'eau distillée stérile. On les laisse gonfler pendant 2 heures lors de dernier rinçage.

Les graines sont mises à germer sur boîtes de Pétri préalablement recouvertes avec une couche de coton stérile imbibé d'eau distillée stérile.

L'incubation des graines est effectuée à température ambiante pendant 3 à 7 jours jusqu'à l'apparition des radicelles (Fig 10).

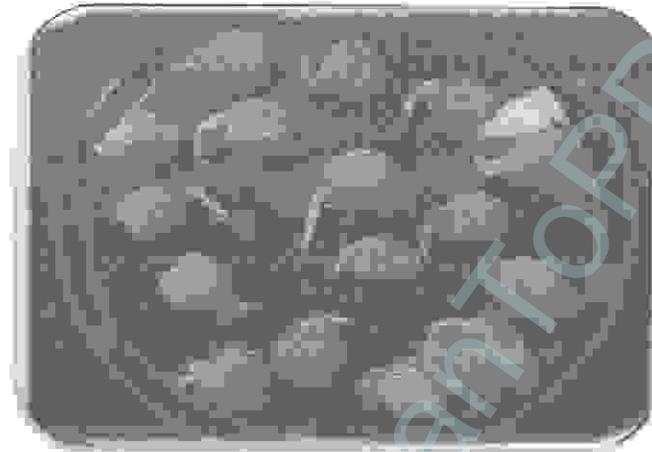


Figure 10 : Germination des graines.

I-7-4 Semis des graines germées :

Le semis des graines sont réalisé 48h avant l'inoculation. Les graines bien germées et dont la longueur de la radicelle varie de 1 à 2 cm de long ont été transférées dans les pots où sont déposées aseptiquement dans un trou de 3 cm de profondeur en orientant la radicelle vers le fond du trou (Fig 11).

Les pots sont placés dans un endroit de culture avec une photopériode lumière/obscurité de 16 h / 8 h.

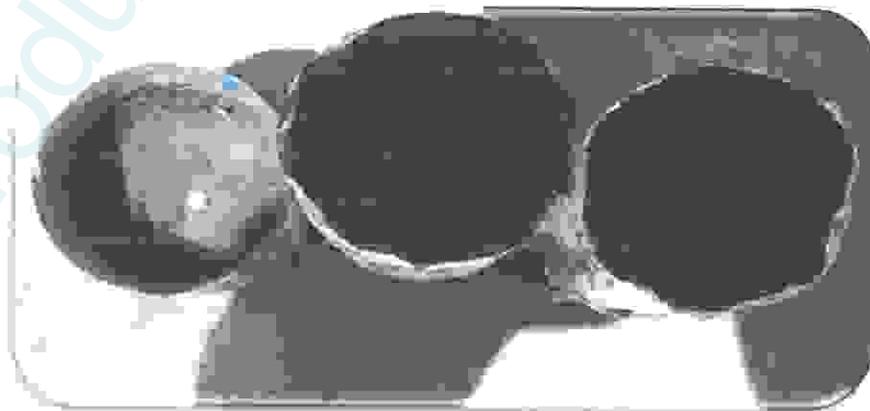


Figure 11 : Semis des graines germées.

I-7-5 Préparation des inoculums :

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

I-7-6 Inoculation des graines :

Après 48h du semis, les plantules sont inoculées avec 2 ml de chaque inoculum versés sur les racines préalablement exposées à l'aide d'une spatule. Deux pots sont utilisés pour chaque souche.

Les plantules sont arrosées deux à trois fois par semaine avec la solution d'arrosage. Après un mois de culture, les plantes ont été déterrées et inspectées pour la recherche des nodules.

Chapitre III

Résultats et discussion

Produced with ScantOPDF

I- Etude des caractères morphologiques

I-1- Sur milieu YMA additionné de Rouge Congo :

Après 24 h d'incubation, l'observation macroscopique des bactéries sur ce milieu à montrer :

La souche 03 : colonies à contour régulier, bombées, brillantes, laiteuses, opaques et non mucilagineuses. (Fig 12.A)

La souche 06 : colonies à contour régulier, blanchâtres, bombés, translucides, brillantes et non mucilagineuses. (Fig 12.B)

Alors que la souche 09, présente un étalement plat, légèrement coloré, translucide, non brillant et mucilagineux. (Fig 12.C)

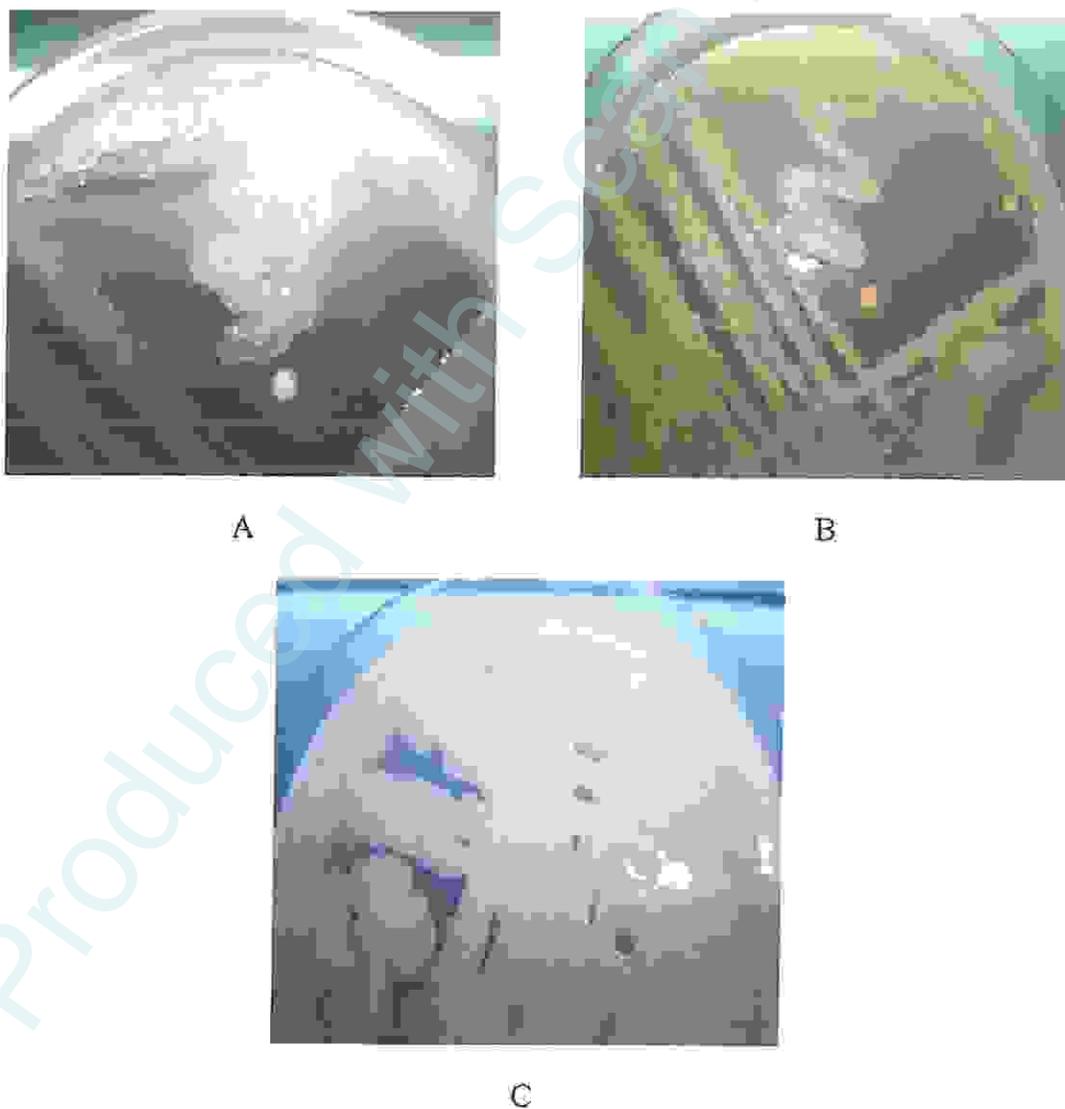


Figure 12 - Aspects macroscopiques des souches 3, 6 et 9.

I-2- Examens microscopiques :

La coloration de Gram des bactéries montre des formes bâtonnets de couleur rose ce qui correspond à des bactéries à Gram négatif.

Concernant la taille des souches, l'observation microscopique montre de courts voire de très courts bâtonnets dans le cas de la souche 09 (Fig 13).

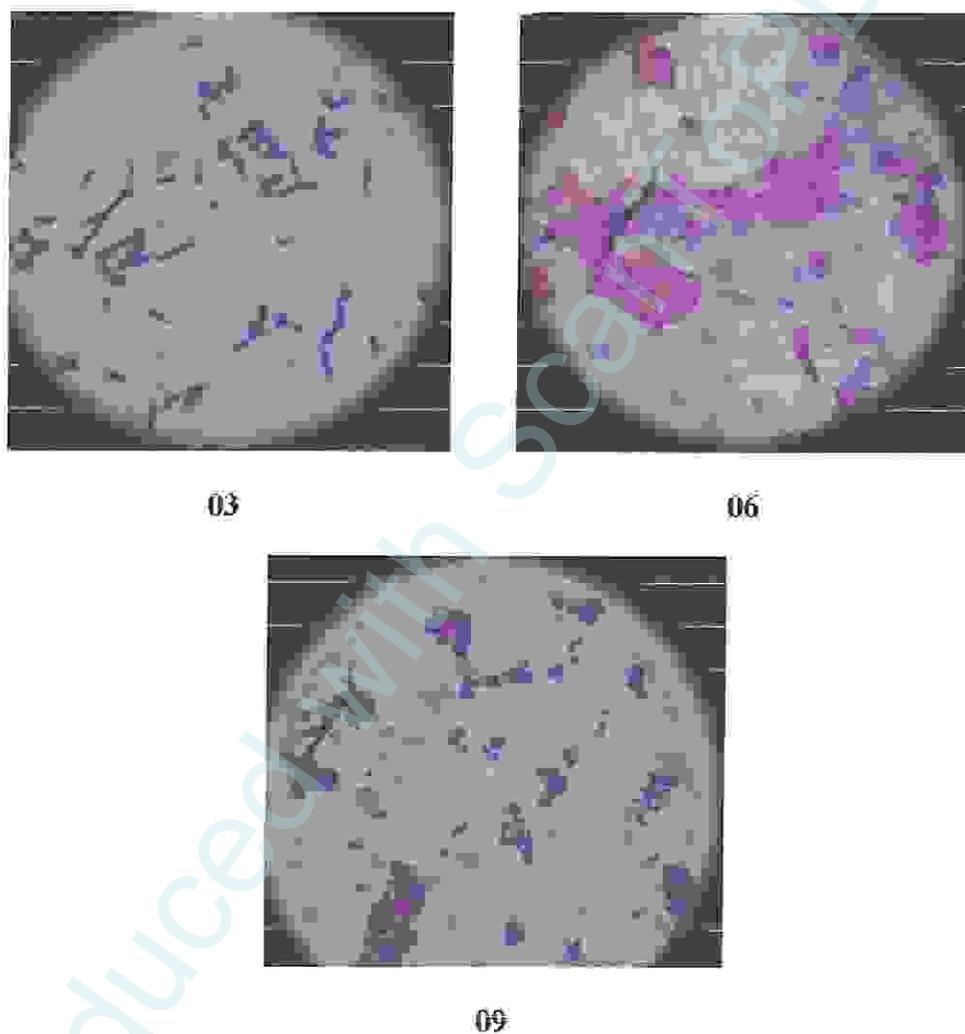


Figure 13: Aspects microscopiques des souches 3,6 et 9.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, et à l'aspect microscopique montre que les bactéries ont la description des rhizobia décrite par Vincent (1970); Somasegaren et Hoben (1994), ce qui nous permet de s'assurer de l'absence de contamination.

II- Extraction de l'ADN plasmidique

La technique d'extraction suivie dans ce travail, nous a permis d'obtenir des précipités d'ADN sous forme de culot, blanchâtre et visqueux.

III- Electrophorèse

La visualisation des bandes d'ADN plasmidique sur gel d'agarose a montré une bande à la sortie du puits sur la piste 3, et une bande à environ 3 cm (Fig 14).

Il est à noter que nous avons rencontré des difficultés à reproduire ces bandes sur photo du fait sans doute de la quantité de matériel obtenu après migration.

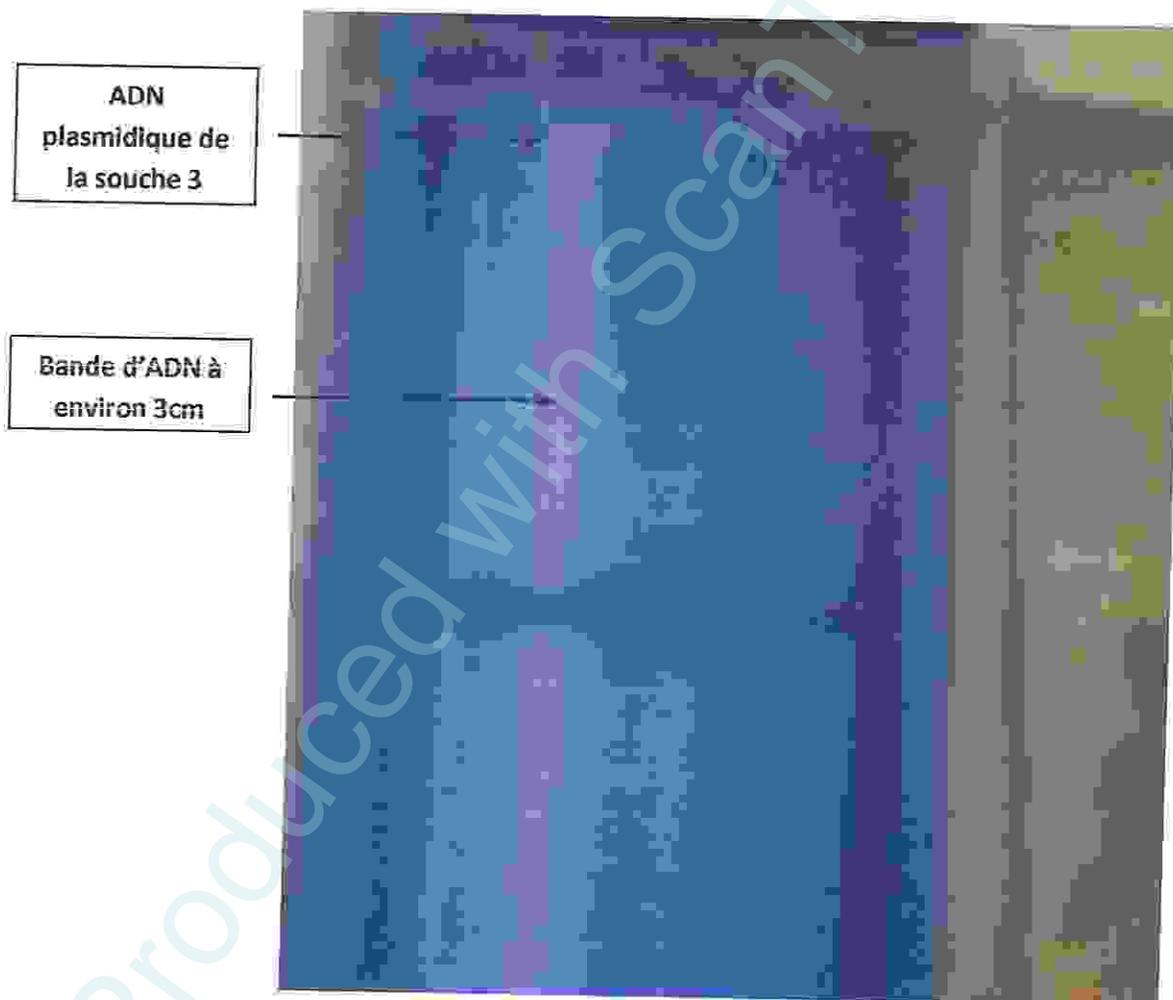


Figure 14: Profil électrophorétique des plasmides extraits de souches.

IV- Transformation

La transformation est réalisée pour mettre en évidence l'acquisition possible de quelques caractères par la souche réceptrice (souche 09) après transformation ; notamment le pouvoir de nodulation.

Les résultats de la transformation sont vérifiés par plusieurs tests.

IV-1 Etude de l'aspect morphologique :

IV-1-1 Sur milieu YMA additionné de Rouge Congo :

L'aspect morphologique de souches transformées montre :

Après transformation par le plasmide de la souche 03, l'aspect macroscopique de la souche 09 devient similaire à celui de la souche 03. D'ailleurs il montre un étalement bombé et des colonies bombées, brillantes, opaques, laiteuses et non mucilagineuses (Fig 15.A).

L'aspect des souches résultant de la transformation de la souche 09 par le plasmide de la souche 06 présente un étalement plat et des colonies à contour régulier, bombées, opaques, blanchâtres et non mucilagineuses (Fig 15.B).

Ces résultats montrent l'acquisition de certains caractères morphologiques qui caractérisent les souches 03 et 06.

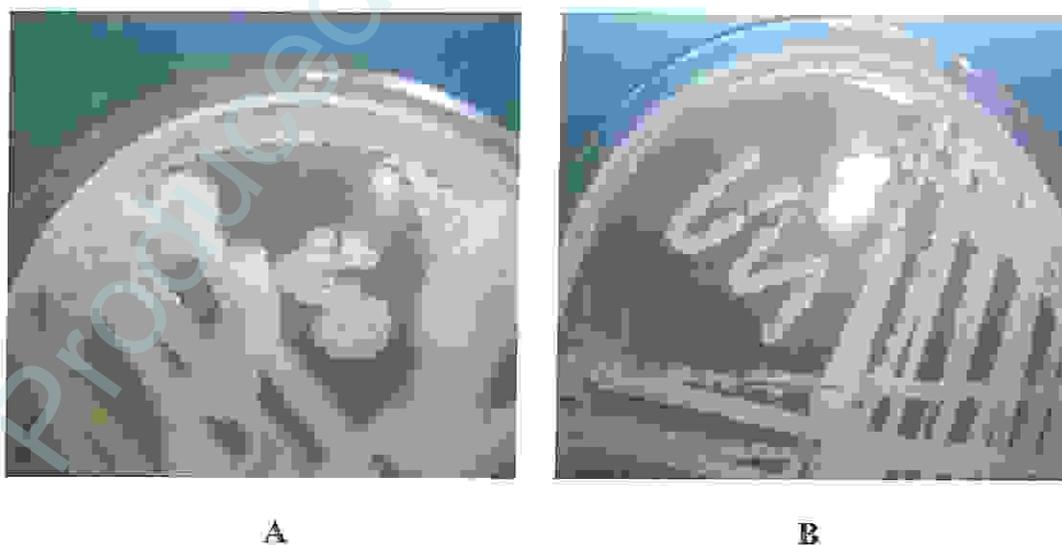


Figure 15 : Aspects macroscopiques des souches transformées 9/3 et 9/6.

Il est important de noter qu'au niveau de chacune des deux boîtes, des colonies avec l'aspect de la souche réceptrice (souche 09) apparaît toujours ce qui peut être expliqué par l'absence d'une transformation totale de l'ensemble des souches réceptrices.

IV-1-2 Examen microscopique :

*Coloration à la fuschine :

L'observation microscopique de bactéries transformées colorées à la fuschine montre que la souche 09 après la transformation par les plasmides de la souche 03 et la souche 06 apparaît sous forme de courts bâtonnet (taille semblable à celle de la souche 03 et la souche 06) (Fig 16).

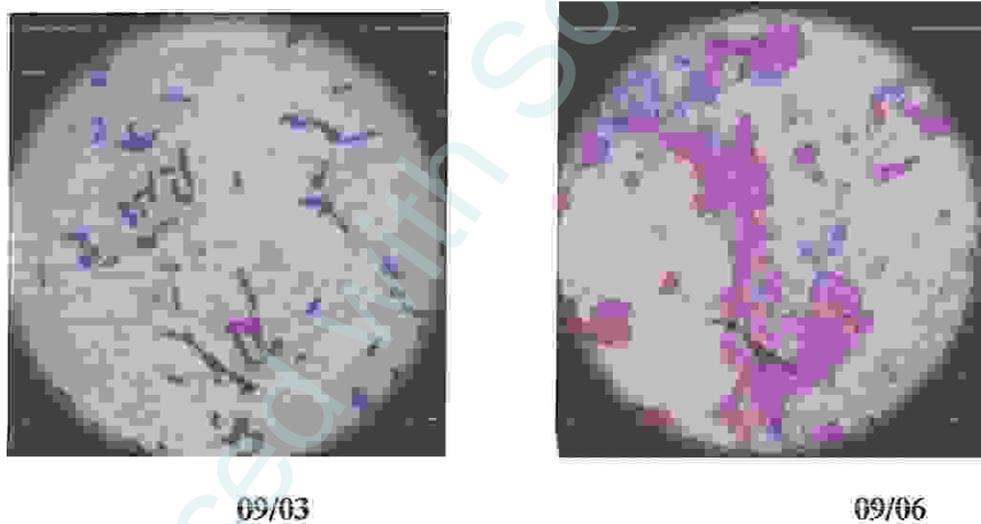


Figure 16 : Aspects microscopiques des souches transformées 9/3 et 9/6.

IV-2 Tests enzymatiques :

Le tableau ci-dessous récapitule les résultats de tests enzymatiques réalisés.

Tableau III : Mise en évidence des enzymes de catalase et d'oxydase.

Enzyme \ Souche	Souche 03	Souche 06	Souche 09	Souche 09/03	Souche 09/06
Catalase	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+

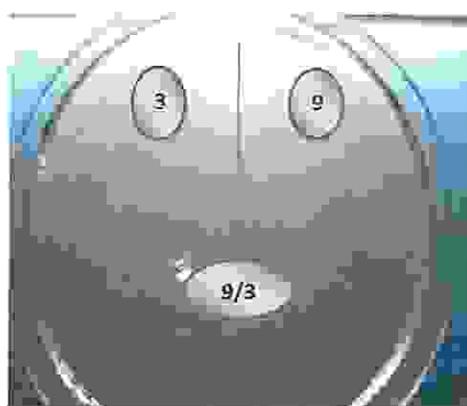
Ces résultats montrent que toutes les souches sauvages ainsi que les souches transformées sont pourvues des ces deux enzymes catalase et oxydase. Ces caractères sont décrit pour les rhizobia dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984).

IV-3 Etude de quelques caractères physiologiques :

IV-3-1 Tolérance à la température :

D'après les résultats, les cinq souches testées présentent une tolérance à des températures qui varient entre 20 °C à 45 °C.

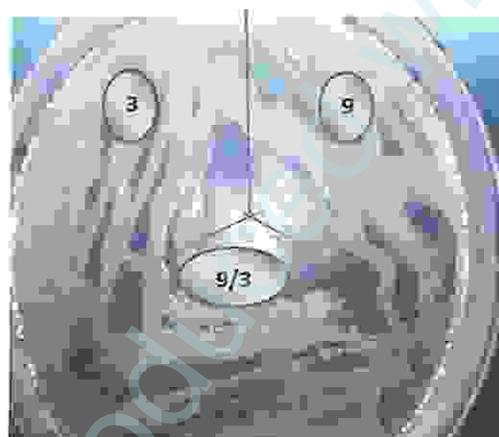
Cependant à 5°C, aucun développement n'a été observé pour l'ensemble des souches (Fig 17);



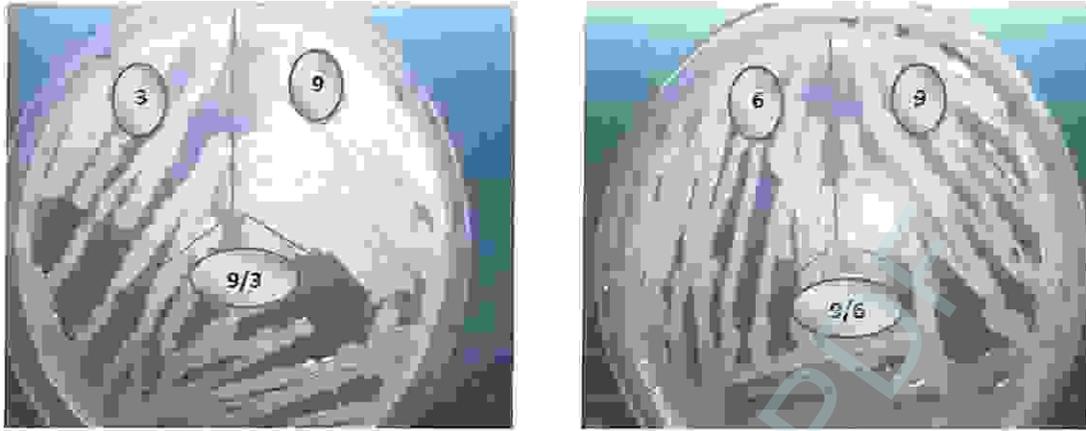
Température 5°C



Température 20°C



Température 37°C



Température 45°C

Figure 17 : Effet de température sur la croissance des souches

3, 6, 9, 9/3 et 9/6.

Nos observations correspondent à celles rapportées par Graham (1994) qui montre que les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui tolèrent des températures qui se situent entre 10 et 37°C.

De plus, la croissance des rhizobia à une température de 45°C a été montrée par plusieurs études.

Nour et *al.*, (1994,1997) suggèrent que la température idéale pour la croissance rhizobienne est de 28°C pour la croissance de l'espèce *Mesorhizobium ciceri*.

IV-3-2 Tolérance au pH :

Les résultats obtenus sur l'étude de tolérance aux pH acide et alcalin de l'ensemble des souches sont présentées par le tableau ci-dessous :

Tableau VI: Effet du pH sur la croissance rhizobienne

Souche \ pH	1	3	5	9	12
03	-	-	+	+	-
06	-	-	+	+	-
09	-	-	-	-	-
09/03	-	-	+	+	-
09/06	-	-	+	+	-

Comme le tableau s'indique, aucune souche n'a toléré les pH acides 1 et 3 ni le pH alcalin 12. La figure 18 illustre l'absence de la croissance bactérienne à ces 3 pH (1, 3 et 12).

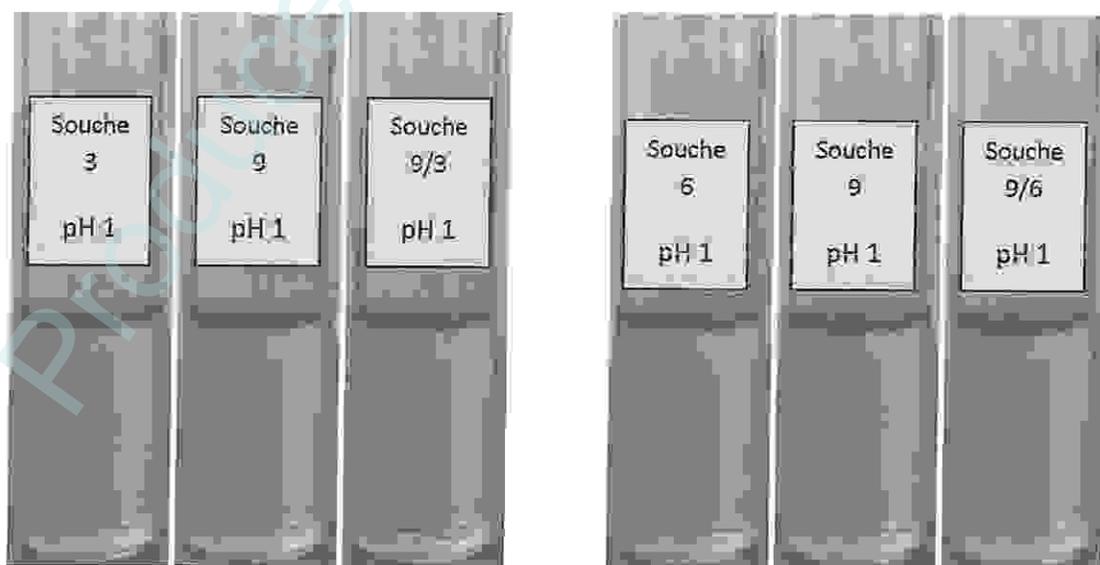




Figure 18 : Effet du pH 1, 3 et 12 sur la croissance des souches 3, 6, 9, 9/3 et 9/6.

(Absence de croissance)

Cependant, mise à part la souche 09 toutes les souches tolèrent les pH 5 et 9, alors qu'après la transformation, la souche 09 devient tolérante à ces deux pH. La figure 19 illustre la tolérance de la souche 09 aux pH 5 et 9 après la transformation.

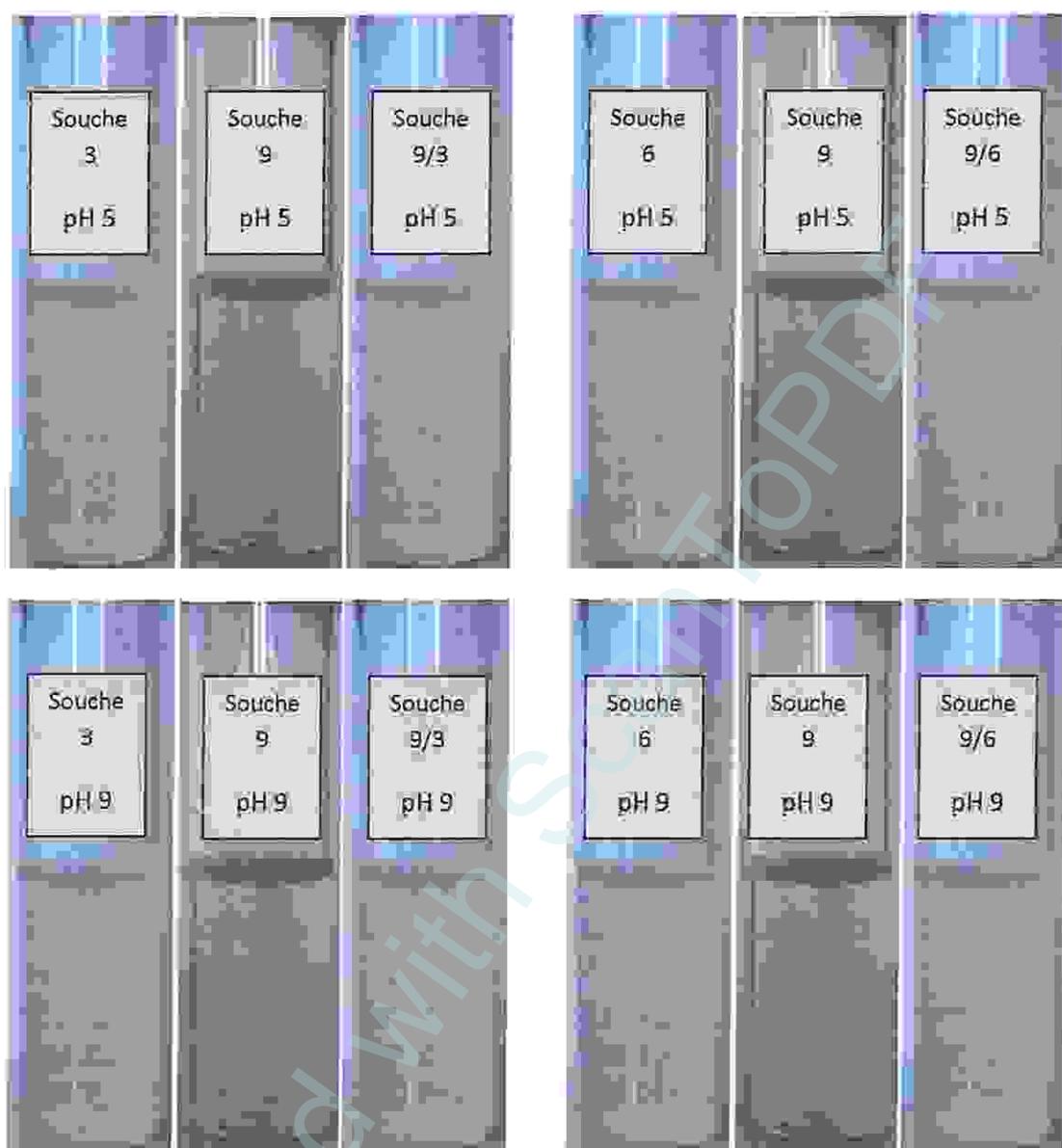


Figure 19 : Effet du pH 5 et 9 sur la croissance des souches 3, 6, 9, 9/3 et 9/6.

Nos résultats sont en accord avec Graham (1964) et Jordan (1984), où les rhizobia peuvent croître à des pH allant de 4,5 jusqu'à 9. Ainsi Raza et coll. (2001) ont trouvé que les rhizobia sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10).

IV-3-3 Tolérances à la salinité :

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus concernant l'influence de la concentration en NaCl sur la croissance des souches testées.

Tableau V: Tolérance des rhizobia à différentes concentrations de NaCl

NaCl \ Souche	2%	5%	8%	11%
03	++	++	+	-
06	++	++	+	-
09	+	++	+	-
09-03	++	++	+	-
09-06	++	++	+	-

++ : Bonne croissance

+ : Croissance moyenne

- : Absence de croissance

Les résultats obtenus et présentés dans le tableau ci-dessus, montrent que toutes les souches tolèrent à des concentrations de NaCl variant de (2% à 8%), ce qui correspond aux résultats de Gaur et Sen (1981) affirmant que les rhizobia nodulant le pois chiche tolèrent plus de 2% de NaCl. Cette tolérance est due au fait que des

rhizobia s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran, 1999).

Cependant à une concentration de 11% aucune croissance n'est observée chez la totalité des souches. La figure 20 illustre l'absence de la croissance des souches à 11% de NaCl.



Figure 20 : Effet de la concentration 11% de NaCl sur la croissance des souches (Absence de croissance).

Il est à noter que toutes les souches ont une croissance moyenne à la concentration 8%. La figure 21 illustre le faible taux de croissance de la totalité des souches.

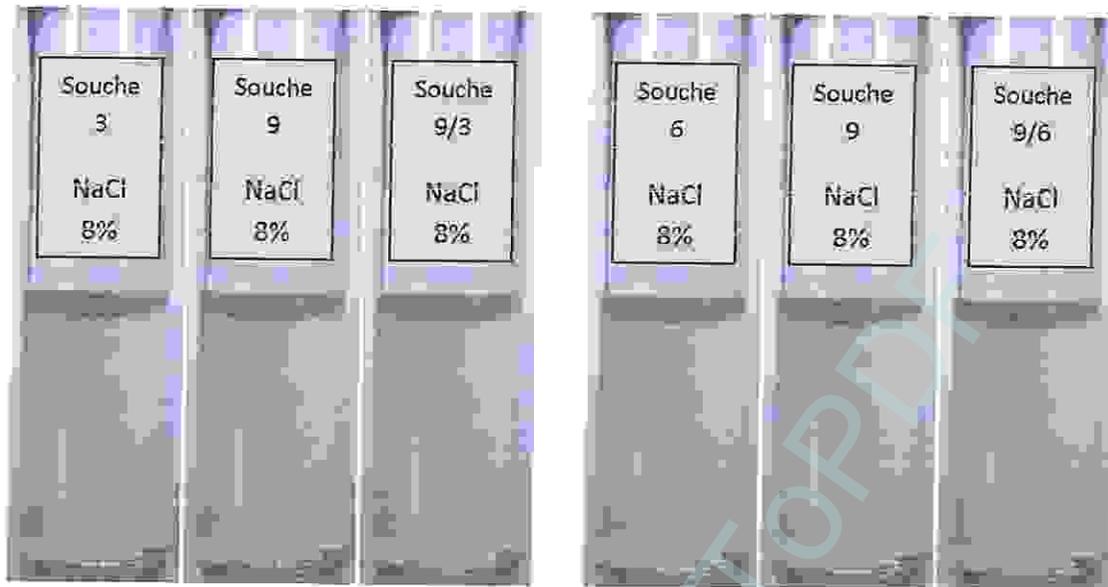


Figure 21: Effet de la concentration 8% de NaCl sur la croissance des souches

Alors qu'aux concentrations de 2% et 5% toutes les souches ont une bonne croissance (Fig 22), à l'exception de la souche 09 qui présente une croissance moyenne à la concentration de 2%, et qui devient bonne après la transformation. La figure 23 illustre la bonne croissance de la souche 09 après la transformation.

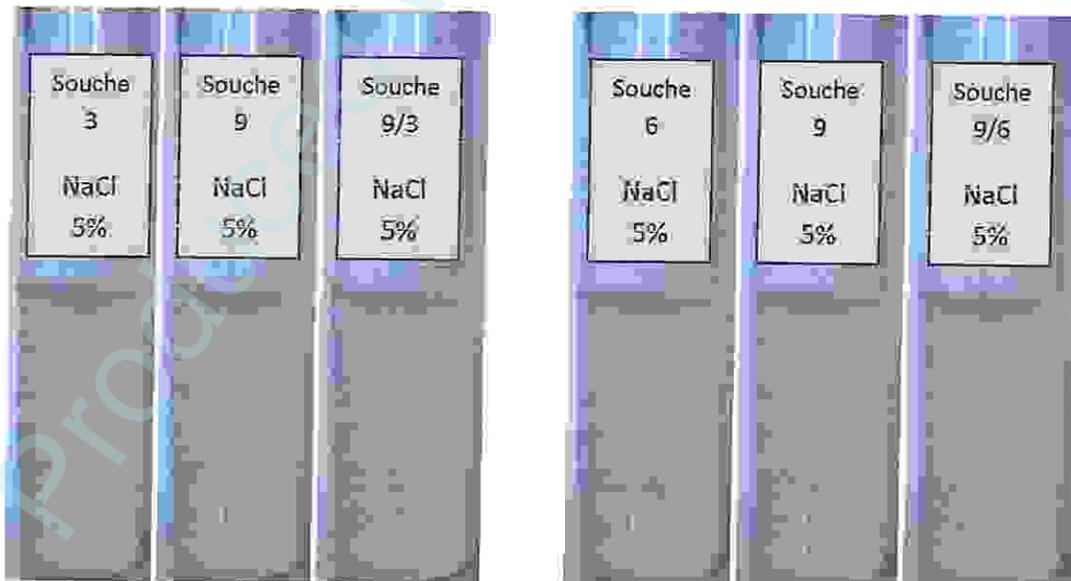


Figure 22 : La bonne croissance des souches à 5% de NaCl

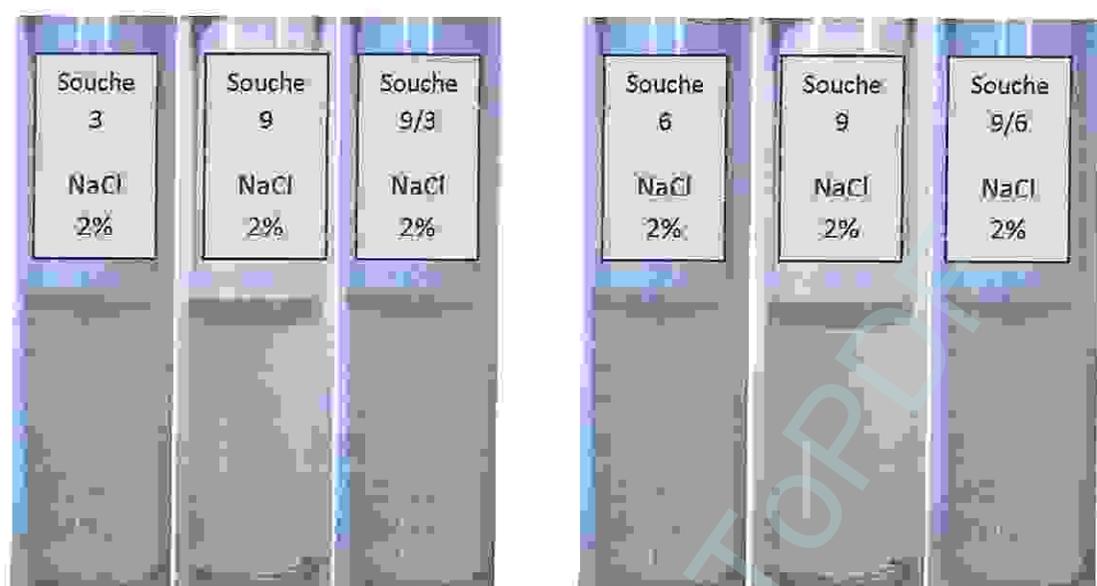


Figure 23 : Effet de la concentration 2% de NaCl sur la croissance des souches.

IV-3-4 Tolérance aux métaux lourds :

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous concernant l'effet des différentes concentrations des métaux lourds sur la croissance des Rhizobia.

Tableau IV: Effet des différentes concentrations des métaux lourds sur la croissance rhizobienne

Souche \ Métaux lourds	Fe	Al	Co	Pb
03	+	+	-	++
06	+	+	-	++
09	-	+	+	+
09-03	+	+	+	
09-06	+	+	+	++

D'après le tableau, nous remarquons que la souche 03 et la souche 06 présentent une faible tolérance aux Fe à 250µg/ml et Al à 250µg/ml traduite par une légère croissance, et elles montrent une bonne croissance au Pb à 250µg/ml. Alors qu'elles n'ont pas pu tolérer le Co à 25µg/ml.

Cependant, la souche 09 présente un faible taux de croissance à 250µg/ml d'Al, 25µg/ml de Co et 250µg/ml de Pb, et une absence de croissance à 250µg/ml de Fe. Mais, et après la transformation, cette souche a pu tolérer la concentration du Fe et elle montre une bonne tolérance au Pb (Fig 24).



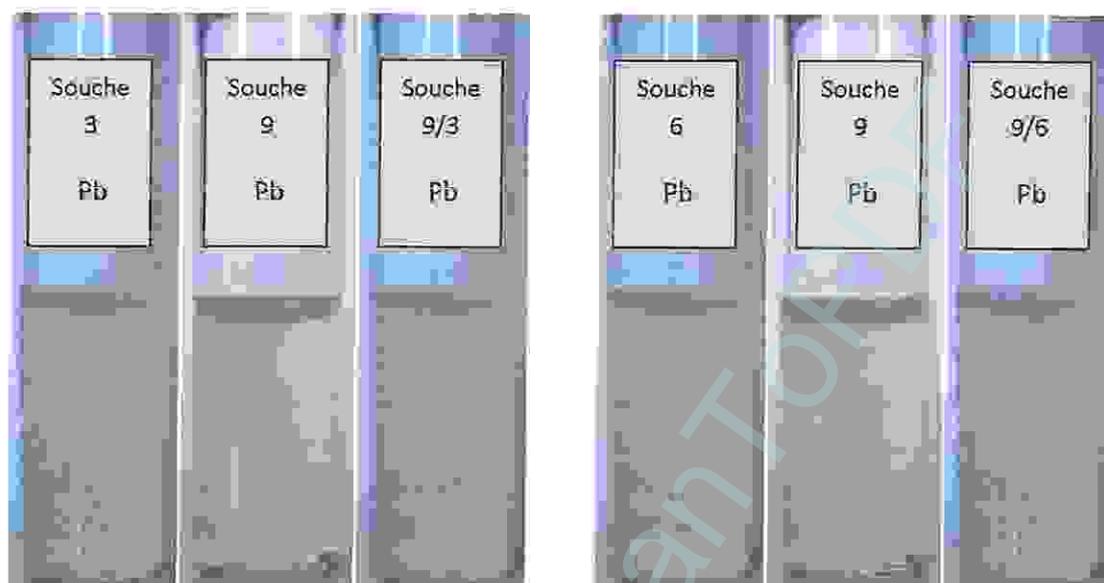


Figure 24 : Effet des différentes concentrations des métaux lourds sur la croissance des souches 3, 6, 9, 9/3, 9/6.

V- Test de nodulation

Dans notre étude, nous avons évalué la capacité de nos souches (3, 6, 9, 9/3 et 9/6) de former des nodules sur la racine de plante pois chiche (*Cicer arietinum*. L).

Une première vérification a été effectuée après 04 semaines, l'observation n'a révélé aucune formation de nodule, au niveau des racines qui sont encore très fines. Devant cette situation, il est nécessaire de prolonger encore la culture pour permettre un bon développement de la racine et une possible apparition des nodules.

Conclusion

Produced with ScantOPDF

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'obtenir à partir de rhizobiums nodulant le pois chiche, des souches qui peuvent être utilisées dans la production d'inoculum, sachant que ces dernières sont sélectionnées en fonction de leur aptitude à noduler la plante hôte et leur comportement vis-à-vis quelques contraintes environnementales.

Nous avons procédé à une transformation entre deux souches nodulant le pois chiche présentant un pouvoir d'infectivité différent.

Notre travail porte sur une étude comparative entre les souches donatrices et la souche transformée.

La culture des différentes souches sur le milieu YMA + RC ainsi que l'examen microscopique, ont montré que la transformation par un plasmide peut conduire à l'acquisition de caractères morphologiques.

L'étude de l'effet des facteurs intrinsèques montre que toutes les souches présentent une croissance optimale dans l'intervalle de 20 à 37° C. Elles sont considérées comme thermorésistantes du fait qu'elles présentent une croissance même à 45 C°.

Les résultats de l'effet du pH révèlent la croissance des souches à des valeurs comprises entre 5 et 9. A l'exception de la souche 09 qui ne tolère ces valeurs qu'après transformation.

L'étude de l'effet de salinité montre que les souches sont halotolérantes et peuvent résister à des concentrations de 8% de NaCl. Cependant, une bonne croissance est observée à des concentrations de 2 et de 5%.

La croissance à l'origine moyenne de la souche 09 à la concentration de 2% est devenue bonne après transformation.

A l'issue de ce travail nous considérons que nous avons plus ou moins atteint notre objectif de départ à savoir la démonstration du pouvoir transformant de l'ADN plasmidique des souches rhizobiennes.

Comme projection à partir de ce travail, il serait intéressant de :

- Vérifier et récupérer les nodules à partir des plantes cultivées *in vitro*.
- Mesurer l'efficacité des bactéries.
- Obtenir des souches tolérantes aux différents stress environnementaux et les exploiter dans des essais d'inoculation.
- Caractériser génétiquement les bactéries effectrices pour une meilleure compréhension des mécanismes de fixation de l'azote atmosphérique.

Résumé

Produced with ScantOPDF

Résumé

Au cours de notre travail, nous avons utilisé des souches rhizobiennes nodulant les racines de pois chiche pour étudier la possibilité de transférer des caractères portés par le plasmide d'une bactérie à une autre. Après l'extraction DES ADN plasmidiques et leur incorporation à l'intérieure d'une bactérie réceptrice en état de compétence, cette dernière a acquit quelques caractères qui sont vérifiés par plusieurs tests.

Mots clés : Rhizobium, légumineuses, symbiose, nodulation, plasmide, transformation bactérienne

Produced with ScanTopdf

Abstract

During our work, we have used strains of rhizobium that nodulate the roots of chickpea to study the possibility of transforming the characters carried by the plasmid from one bacterium to another. After extraction of plasmid DNA and their incorporation into recipient bacterium which is in state of competence, it was revealed that this latter have acquired some characters which were checked by several tests.

Key words: Rhizobium, legume, symbiosis, nodulation, plasmid, bacterial transformation

Produced with Scantopdf

الملخص

قمنا خلال عملنا هذا باستعمال أنواع من بكتيريا العقد الجذرية لنبات الحمص، و ذلك من اجل دراسة إمكانية نقل وتحويل بعض الصفات المحمولة بواسطة البلاسميد من بكتيريا إلى أخرى بعد امتصاص البلاسميد و إتمامه داخل البكتيريا المراد تحويلها، تم اكتساب هذه الأخيرة لبعض الصفات التي تم الكشف عنها بعدة فحوصات.

كلمات المفتاح: ريزوبيا، البقوليات، التعايش، العقد جذرية، البلاسميد، التحول البكتيري.

Références bibliographiques

Produced with ScanTopDF

Références bibliographiques

-A-

Alexander M., 1971. Biochemical Ecology of Microorganisms. Annual Review of Microbiology. 25. 361-392 p.

Alexander M., 1985. Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. Advances in microbial ecology. 8: 163-183 p.

-B-

Bado D.V., 2002. Role des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse de Doctorat. Faculté des études supérieures. Université Laval

Barbour M.W., Dennis I., Hattermann R., Stacey G.T., 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to Soybean Exudates. Applied and environmental microbiology. 57 (09): 2635-2639 p.

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993. Practical *Rhizobium*- Legume Technology Manual. ICARDA. 19 : 389 p.

Bogusz, D.; Franche, C. (1985)- Fixation biologique de l'azote: l'ORSTOM et les recherches fondamentales. Dakar. ORSTOM. 13 p

Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992. Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology. Rockefeller University, New York. 03. 239-248 p.

Brinboin H., Dolys S., 1979. A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523 p.

Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X., 2000. Keys to Symbiotic Harmony" Journal of Bacteriology. 182(20): 5641-5652 p.

-C-

Cacciari L., Di Mattia E., Quattrini P., Moscatelli M., Grego S., Lippi D., De Paolis M.R., 2007. Réponses adaptatives des isoïats de *Rhizobium* aux stress. *Acqua radhana*. Edition IRD, Paris. p 183-200

Chao W.L., Alexander M., 1982. Influence of soil characteristics on the survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Science Society of America*. 46 (05): 949-952 p.

Chabi R., 2009. Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister, Université de Constantine

Chataigné G., 2007. Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale science de la matière. Université de Toulouse.

Crossman L.C., 2004. Plasmid replicons of *Rhizobium*. *Biochemical Society Transactions*. 33 (01): 57-158 p.

-D-

Date R.A., Halliday J., 1987. Collection and maintenance of Rhizonia. *Symbiotic nitrogen fixation technology* 1: 14-24 p

Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris. 383 p.

Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C., 2001. nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*. 48 (02): 359-365 p.

Denarié J., 2000. Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs. Mission 2000 en France. UTLS la suite.

Duhoux E., Nicole M., 2004. Biologie végétale Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD, Paris 166 p.

Dupux Y., Nougier P., 2005. Les micro organismes: du gène à la biosphère. Edition Ellipses, France. 256 p

-E-

El-hilali, 2006. La symbiose *Rhizobium-Lupin* : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences. Université de Mohammed V – agdal. Rabat

Elsheikh E.A.E., Wood M., 1989 a. Response of chickpea and soybean 21 rhizobia to salt: influence of carbon source, temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry.* (07): 883-887 p.

Evans J., Wallace C., Dobrowolski N., Pritchard., O'connor G.E., Sullivan B., 1993 b. Requirement for inoculation of field pea with *Rhizobium* and lime pelleting seed in soils of western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 33 (6): 767 – 773 p.

-F-

Fellay R., Rochepeau P., Relic B., Broughton W.J., 1993. Signals to and emanating from 'Rhizobium' largely control symbiotic specificity. Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Elsevier Science. 01: 199-220 p.

Finnie C., Hartley N.M., Findlay K.C., Downie J.A., 1997. The *Rhizobium leguminosarum* Prs DE genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol Microbiol.* 25 (01): 135-146 p.

François J., Gaudry M., 1997. Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Edition Quae. P 422.

Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D., Luczak C., 2004. Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. Edition Dunod, Paris. 549 p

-G-

Cage D.J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68 (02): 280-300 p.

Gaur Y.D., Sen A.N., 1981. Cross inoculation group specificity in Cicer Rhizobium symbiosis. *New Physiology.* 83: 745-754.

Gharzouli R., 2006. Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. Mémoire de Magister. Faculté des Sciences de la Nature et de la vie. Université de Constantine

Gough C., 2009. *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. *Interactions plantes/micro-organismes*, 28 (298): 30-33 p.

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

-H-

Höfte M., Alexander M., 1977. Further Evidence for the regulation of bacterial population in soil by protozoa. *Archives of Microbiology.* 113 (03): 181-183 p.

Heljnen C.E., Van Veen J.A., 1991. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiology Letters.* 85 (01): 73-80 p.

Henzell E.E., 1988. The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil.* 108 (01): 15-21 p.

Hirsch P.R., 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 113: 219-228 p.

Hirsch P.R., 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.* 133: 159-171 p.

Hopkins W.G., 2003. *Physiologie végétale* Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck, Paris. 532 p.

Howard J.B., Rees D.C., 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 04 (05): 559-566 p.

Hozore L., Alexander M., 1991. Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. *Soil Biology and Biochemistry*, 23 (08): 717-723 p.

-J-

Jordan D.C., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Williams & Wilkins Baltimore. 1: 234-242 p.

-K-

Keya S.O., Alexander M., 1975. Regulation of parasitism by host density: the *Bdellovibrio/Rhizobium* interrelationship. *Soil Biology and Biochemistry*, 7 (03): 231-237 p.

Kondorosi E., Kondorosi A., 2000. Control of root nodule organogenesis. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham. P 449-466.

-L-

Laranjo M., Branco C., Soares R., Aího L., Carvalho M.D.E., Oliveira S., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Applied Microbiology*, 92 (06): 1043-1050 p.

Lucinda S.S., Sharon R.L., 1998. Requirements for *syrM* and *nodD* Genes in the Nodulation of *Medicago truncatula* by *Rhizobium meliloti*. *American Phytopathological Society*, 11(09): 937-940 p.

-M-

Madigan M., Martink J., 2007. Brock Biologie des microorganismes. Edition Person Education France. 1047 p.

Mannal R.T., 2004 Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum*, L.) :Inoculation et nodulation. Mémoire de Magister. Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Constantine.

Monchy S., 2007. Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles.

Masson P., Gintzburger G., 2000. Les légumineuses fourragères dans les systèmes de production méditerranéens: utilisations alternatives. *Option Méditerranéennes*, 45: 395-406 p.

-N-

Nour S. M., Fernandez M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.C., 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Society for General Microbiology*, 44 (03): 640-648 p.

Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Normand P., Fernandez M.P., 1995 Genomic Heterogeneity of Strains Nodulating Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and Description of

Rhizobium mediterraneum sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 45 (4): 640-648 p.

-P-

Parent L.E., 1999. Notes de cours de Fertilisation des sols. Département des sols et de génie agroalimentaire. Université Laval, Québec

Pelmont J., 1995. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Edition EDP Sciences, France. 1040 p

Pelmont J., 2005. Biodégradation et métabolisme. Edition EDP Sciences, France. 798 p

Perry J.I., Staley J.T., Fory S., 2004. Microbiologie. Edition Dunod, Paris... ..

Postma J., Walter S., Van Veen J.A., 1989. Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii*. Soil Biology and Biochemistry. 21 (03): 437-442

Prescott L.M., Harely J.P., Kelein D.A., 2003. Microbiologie. Edition Deboeck. 1137 p

-R-

Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E., 2000. Biologie végétale. Edition de boeck , Paris. 944 p

Raymond C., 1993. Génétique bactérienne. Edition Vigot. 206 p

Raza S., Jørgensen B., Anou-Taieb H., Christiansen J.L., 2001. - Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. Applied Microbiology. 32 (6): 379-383 p.

Richter G., 1993. Métabolisme des végétaux. physiologie et biochimie. Edition press polytechniques et universitaires. Romandes. 526p

-S-

Saoudi M., 2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister Département de Biologie Végétale, Université de Constantine.

Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S., 2002. Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 15 (09): 866-874 p

Selose M.A., 2009. La symbiose : Structure et fonction, rôle écologique et évolutif. Edition Vuibert. Paris. 149 p.

Sharma P.K., Kundu B.S., Dogra R.C., 1993. Molecular mechanism of host specificity in legume-Rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.* 11 (04): 741-779 p.

Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Martínez-Romero E., Souza V., 2003. *Rhizobium* *elli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico. Population Genetics and Biogeographic Implications. *Applied and environmental microbiology*. 69 (02): 894-893 p.

Sinclair T.R., Muchow R.C., Ludlow M.M., Leach G.J., Lawn R.J., Foale M.A., 1987. Field and model analysis of the effect of water deficits on carbon and nitrogen accumulation by soybean, cowpea and black gram. *Field Crops Research*. 17 (02): 121-140 p.

Singh G., Singh H., Dillon T.S., 1985. Some aspects of seed extraction in tomato. *Seed Res.* 13: 67-72 p

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia, methods in legume-rhizobium technology. Edition Springer-Verlag. New York. 450 p

Sprent J.L., 1984. Effects of drought and salinity on heterotrophic nitrogen-fixing bacteria and on infection of legumes by *rhizobia*. *Advances in Agricultural Biotechnology*, 04; 295-302 p.

-T-

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister. Département des Sciences de la nature et de la vie. Université de Constantine

Tortora G.J., Funk B.R., Case C.L., 2003. Introduction à la microbiologie . Edition du Renouveau Pédagogique Inc. St-Laurent. 945 p

Tourté Y., Bordonneau M., Henry M., Tourte C., 2005. Le monde des végétaux. Edition Dunod, Paris. 384 p

Trevaskis B., Colebatch G., Desbrosses G., Wandrey M., Wienkoop S., Saalbach G., Udvardi M., 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic Nitrogen fixation. *Comp Funct Genom.* 03 (02).151-157 p.

Traore S. A., 1991. Contribution à l'étude de la nodulation de tige par rhizobium chez une légumineuse aquatique, *Sesbania pubescens* DC. Mémoire d'études approfondies Département de biologie végétal. Université Cheikh anta diop. DAKAR

-V-

Vandamme P., Poi B., Gillis M., De Vos M., Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*. 60 (02): 407-438 p.

Vincent J. M., 1970. - The manual for the practical study of root nodule bacteria. Edition Blackwell Scientific Publication. United Kingdom. 164 p.

-W-

Waligora C., 2008. Légumineuses: il est urgent de les réhabiliter. Techniques culturales simplifiées. 48: 12-22 p.

Weller D.M., 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology. 26: 379-407 p.

Werner D., 1992. Symbiosis of plants and microbes. Edition Chapman & Hall, Germany. 256 p.

Wey J., Obaton M. 1978. Incidence de quelques techniques culturales sur l'activité fixatrice d'azote et le rendement de l'arachide. *Agronomie Tropicale*. 33 (2): 129-135 p.

-Z-

Zaharua H.H., 1991. Conditions for successful *Rhizobium-legume* symbioses in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*. 12 (01): 73-80 p.

Zakbia F., de Lajudie P., 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomy*. 21. 569-576 p.

Zakhia F., de Lajudie P., 2006. La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Revue canadienne de microbiologie*. 52(03): 169-181 p.

Sites web :

Site web n°01 Perrin J.F. Biotechnologies et Bioanalyses. Assimilation du diazote. Disponible en ligne : http://www.perrin33.com/microbiologie/azote/entree-n_3.php#1.1

Site web n° 02 : Ekopedia.Legumineuse. Cicer arietinum. Disponible en ligne : http://fr.ekopedia.org/Cicer_arietinum

Site web n° 03: biosol. La symbiose rhizobium-légumineuses. Disponible en ligne : <http://biosol.esitpa.org/liens/rhizo2003/nodulation.htm>

Site web n° 04 : Philippon A. 2000. **Genétique bactérienne** Campus de microbiologie médicale. Disponible en ligne : <http://www.microbe-edu.org/etudiant/gene2.html>

Site web n° 05 : Euzéby J.P. Introduction à la génétique bactérienne. Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Disponible en ligne : <http://www.bacteriologie.net/generale/genetiqueintro.html>

Site web n° 06: Poyar C. 2003. Transfert de l'information génétique. Faculté de médecine Necker-Enfants malades.Bactériologie generale. Disponible en ligne : <http://webpharma.france.com/EXPOSES/3.pdf>

Site web n° 07 : *Bactériologie*. 2003. Genetique bactérienne. Disponible en ligne : <http://www.cbups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/index.html>

Site web n° 08 : Biologie Multimédia. Microbiologie. Transgénèse bactérienne. Disponible en ligne : <http://www.snv.jussieu.fr/bm>

Annexes

Produced with ScantOPDF

Annexes

Milieu YEB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Lajeudi et al ; 1998) :

K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
NaCl	0.05
CaCl ₂	0.04
FeCl ₃	0.004
Glutamate de sodium	0.5
Mannitol	10
Extrait de levure	1
pH : 6.8	

Milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) en g/l (Lajeudi et al ; 1998) :

YEMB	1000ml
Agar	20
pH : 6.8	

Milieu YEMA additionné de rouge Congo (Vincent ; 1970) :

YEMB	1000 ml
Solution de rouge Congo	10 ml
Agar	20
pH : 6.8	

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

Solution d'arrosage :

Faire bouillir 100 g du sol (ramené de l'ITGC) additionné de 1 litre d'eau distillée pendant 10minute puis laisser décompter.

Tampon d'exiruction

Tris-HCl 25mM pH8

EDTA 10mM

NaOH 0.2 mM

SDS 1%

Acétate de sodium : 3M

NaCl : 0.146g

Tampon de transformation

Ca Cl₂ : 1ml

Tampon d'électrophorèse(TBE)

Tris : 45 mM pH 8

Acides Borique : 45 mM

EDTA : 1.25 mM

Agarose : 1%

Bromure d'éthidium : 0.5 µl

Produced with ScanTOPDF