

**Université des Sciences et de Technologie Houari Boumediène  
Faculté des Sciences Biologiques**

**THESE**

présentée par

**Mlle Hamida SADJI**

En vue de l'obtention du diplôme de

**Magister en Biologie**

Option

**Ecobiologie et amélioration végétale**

Portant sur le thème

**Etude de la symbiose entre *Rhizobium leguminosarum* biovar  
trifolii et *Trifolium alexandrinum* L (trèfle d'Alexandrie) :  
aspects microbiologiques et physiologiques**

Soutenue publiquement le 19/03/2003 devant le jury composé de :

<b>Mme N. BOUGUEDOUR</b> professeur	<b>FSB-USTHB</b>	<b>Président</b>
<b>Mme H. HOCINE</b> Maître de conférences	<b>UMMTO</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr S. M. OUNANE</b> Chargé de cours	<b>INA</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mlle F. AID</b> Maître conférences	<b>FSB-USTHB</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mr S. AMRANI</b> Chargé de cours	<b>FSB-USTHB</b>	<b>Co-Directeur de thèse</b>

## **AVANT-PROPOS**

Au terme de ce travail réalisé au sein du laboratoire de Biologie des sols, je tiens à exprimer mes vifs remerciements à :

**M.AMRANI S.** Chargé de cours à la FSB de l'USTHB , pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire , les efforts fournis afin de concrétiser ce travail et pour la mise à ma disposition de tous les moyens nécessaire durant toute ma formation.

**Melle AID F.** maître de conférences à la l FSB de l'USTHB, pour l'intérêt apporté pour la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent à **Mme BOUGUEDOURA N.** Professeur à la FSB de l'USTHB pour avoir accepter de présider le jury de soutenance.

**Mme Hocine H.** maître de conférences à l'UMMTO pour avoir accepter d'examiner ce travail.

**Mr OUNANE S. M.** maître de conférences à l'INA d'El-Harrach pour avoir accepter d'examiner ce travail.

**Mr KACI Y.** Chargé de cours à la FSB de l'USTHB pour tous ses conseils et encouragements.

Je remercie également tous les étudiants que j'ai connu au laboratoire de biologie des sols pour les bons moments passés ensemble.

Sans oublier l'équipe du laboratoire : **NAZIHA-FARIDA, ASSIA** et **DJAMILA** qu'elles trouvent ici toute ma reconnaissance pour leur aide, leur gentillesse, leur soutien moral... pour tous.

## Résumé

L'établissement de la symbiose entre *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (souche LBS 107) et le *Trifolium alexandrinum* L. (Bersim) variété Tigri s'est révélé un phénomène rapide puisque les plantules de Bersim sont déjà nodulées 10 jours après leur inoculation. Cette interaction confère aux plantes de Bersim la propriété d'assurer l'essentiel de la couverture de leurs besoins en azote.

Cette symbiose entre *R. leguminosarum* biovar *trifolii* et les trèfles (*Trifolium spp*) est un phénomène relativement répandu dans les sols d'Algérie. En effet, les 37 légumineuses (21 espèce) du genre *Trifolium*, prélevées sur le terrain, se sont montrées nodulées et fixatrices d'azote.

De même, 30 sols provenant de différentes localités de différents étages bioclimatiques d'Algérie se sont révélés, *ex-situ*, capables d'induire la formation des nodules efficaces chez les plantules de Bersim.

L'utilisation de ces deux stratégies d'évaluation, *in-situ* et *ex-situ*, du pool de *Rhizobium* des sols d'Algérie vis-à-vis du Bersim nous a permis de montrer que :

-le souchier issu du piégeage est dans l'ensemble plus performant sur, le plan symbiotique que celui issu de l'extraction. Cette supériorité résulte du fait que dans le piégeage, la plante sélectionne à partir du pool rhizobien du sol qui la supporte la souche avec laquelle elle a le plus d'affinité. Alors que dans le cas de la méthode « extraction », on impose au Bersim une souche sélectionnée par un autre trèfle.

-l'analyse par taxonomie numérique des profils phénotypiques (110 caractères) des souches de *Rhizobium* associées au Bersim indique que les deux variétés testées semblent sélectionner des pools de *R leguminosarum* biovar *trifolii* différents.

**Mots-clés** : symbiose, *Trifolium alexandrinum* L., *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, potentiel des sols, diversité, taxonomie numérique.

# Sommaire

---

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I - Etude bibliographique</b> .....	6
1- Le macrosymbiote: les légumineuses et le Bersim .....	6
2- Le microsymbiote: les <i>Rhizobium</i> .....	7
3- L'établissement de la symbiose: <i>Rhizobium</i> -légumineuses.....	11
3-1- Spécificité de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses .....	12
3-2- Formation du nodule.....	16
4- Structure du nodule .....	20
5- La fixation biologique de l'azote atmosphérique.....	23
<b>Chapitre II - Matériel et méthodes</b>	
<b>1- Matériel</b>	
1-1- Matériel végétal .....	28
1-2- Milieux de culture.....	28
1-3-Souches bactériennes .....	29
<b>2- Méthodes</b>	
2-1- Stérilisation superficielle des semences .....	30
2-2- Stratégies de constitution du souchier .....	31
2-3- Extraction, isolement et purification des souches .....	31
2-5- Techniques d'inoculation .....	40
2-5-1- Taille de l'inoculum sur la symbiose .....	40
2-5-2- Age de l'inoculum sur la symbiose .....	40
2-5-3- Age de la plante sur la symbiose.....	40
2-6- Etablissement de la symbiose .....	40
3- Détermination des Caractéristiques des souches de <i>Rhizobium</i> .....	41
3-1- Mesure de la croissance des souches .....	45
3-2- Mesure de la production des EPS .....	45
4- Traitement statistique .....	45
5- Taxonomie numérique .....	46
5-1 Définition et principes.....	46
5-2 Indice de similitude .....	46

## Chapitre III - Résultats et discussion

1- Etablissement de la symbiose <i>Rhizobium</i> -Bersim .....	49
2- Constitution du soucier .....	64
2-1-1 Authentification et sélection des souches de <i>Rhizobium</i> compétentes envers le Bersim .....	66
2-1-2- Performances symbiotiques des souches de <i>Rhizobium</i> vis à vis du Bersim .....	68
2-2-Potentiel symbiotique des sols testés.....	75
3- Caractéristiques des souches retenues.....	85
3-1- Caractéristiques culturales en milieu solide .....	85
3-2- Caractéristiques cellulaires .....	86
3-3- Caractéristiques culturales en milieu liquide.....	86
3-4- Production de polysaccharides .....	92
3-5- Caractéristiques physiologiques .....	94
3-6- Profils de réponse aux conditions physiologiques extrêmes .....	94
3-7- Profil d'utilisation des substrats carbonés .....	98
3-8- Profil de résistance aux agents antibactériens .....	100
3-9- Analyse numérique des profils phénotypiques des souches.....	103
<b>Conclusion générale</b> .....	109
<b>Bibliographie</b> .....	112
<b>Annexes</b> .....	127

## **Introduction**

---

---

## Introduction

---

L'azote assure la pérennité de la vie sur la terre. Il rentre dans la composition des organismes vivants. Il se trouve sous forme d'acides aminés, protéines, acides nucléiques.

Les végétaux n'assimilent l'azote que sous forme combinée ammoniacale, nitrate. En raison de leur faible représentativité dans le sol, le nitrate et/ou l'ammoniac constituent un facteur limitant de la croissance des plantes. D'où le recours à l'utilisation des engrais azotés chimiques, coûteux en énergie, pour augmenter le rendement des récoltes. Cependant, les nitrates sont accusés de la pollution écologique (Vitousek et al., 1997) par l'eutrophisation des eaux de surfaces et souterraines.

En réponse à la demande alimentaire croissante, une alternative à l'utilisation des engrais chimiques, tend à se généraliser dans le monde (Hardy 1993). Il s'agit de la fixation biologique de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>).

L'azote moléculaire est fortement représenté dans la biosphère. Il constitue 80% de l'atmosphère soit 385x10<sup>10</sup> tonnes, d'où l'air est un réservoir en azote qui reste inutilisable par les plantes, sauf s'il est transformé par voie biologique en ammoniac ou en nitrate.

La transformation biologique de l'azote moléculaire de l'air est la propriété de trois grands groupes de bactéries dite diazotrophes ou fixateurs d'azote.

**Les bactéries libres** du genre *Azotobacter*, *Clostridium*, *Derxia*, *Beijerinckia*. Elles sont capables de réduire l'azote (N<sub>2</sub>) en vivant librement dans le sol. En effet, elles peuvent fixer environ 10 kilogrammes d'azote moléculaire par hectare et par an.

\* **Les bactéries associatives;** parmi lesquelles les bactéries du genre *Azospirillum* intimement associées aux racines des Graminées.

\* **Les bactéries symbiotiques** des plantes, représentées essentiellement par trois groupes d'organismes :

- le genre *Rhizobium*, des bactéries associées aux légumineuses des régions tempérées et tropicales (Young et al., 2001),
- les actinomycètes du genre *Frankia*, associés aux plantes du genre *Alnus*, *Casuarina* (Gueltieri et Bisseling, 2000),
- les genres *Nostoc*, *Anabaena*, des cyanobactéries associées à des plantes gymnospermes *cycadales* et/ou à de petites fougères du genre *Azolla* (Parniske, 2000).

Parmi les symbioses fixatrices d'azote, celle qui s'établit entre les *Rhizobium* et les légumineuses est de loin la plus intéressante. En effet, elle peut apporter annuellement plus de 200 millions de tonnes d'azote sans recours aux énergies fossiles et sans pollution.

Dans le cadre du développement durable, l'utilisation de la fixation biologique (N<sub>2</sub>) via la symbiose est adoptée dans le monde par le biais des pratiques agricoles dont certaines sont connues empiriquement depuis l'antiquité :

- la rotation légumineuse-céréale qui peut remplacer une pratique économiquement dépassée (la jachère)
- l'augmentation de la productivité des cultures par les cultures mixtes légumineuses-graminées
- et l'introduction des légumineuses jouant le rôle d'engrais organiques(engrais vert), riche en azoté après leur enfouissement dans le sol.

Après la découverte du rôle des bactéries des nodosités de légumineuses, une pratique plus raisonnée a vu le jour. Elle consiste à la bactérisation des semences et des cultures par l'apport des *Rhizobiums* aux sols.

Cette technique dite «**d'inoculation au champ**» est justifiée dans le cas d'une culture de légumineuse nouvellement introduite ou encore dans le cas des sols pauvres en *Rhizobium*.

En dehors de l'agriculture, la symbiose *Rhizobium*-légumineuses est utilisée pour la protection et la restauration des écosystèmes naturels dégradés ou menacés. Les légumineuses arbustives, comme par exemple *Medicago arborea*, jouent grâce à leur propriété de fixer l'azote, le rôle de plantes pionnières capables de se développer sur les sols appauvris par l'érosion, menacés par l'avancée du sable et par la désertification (Zahran, 2000).

Dans l'optique de la connaissance de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse en vue de la généralisation de son utilisation en Algérie pour l'amélioration de la productivité végétale, que nous avons réalisé ce travail. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche avec l'ANDRU qui vise à l'inventaire et à la préservation des légumineuses en Algérie.

Nous avons retenu comme plante cible pour cette étude, une légumineuse fourragère, le Bersim ou trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum* L.), du fait que c'est la légumineuse fourragère, la plus utilisée en Algérie, en particulier au Nord et dans les Hauts-Plataux), ou elle est très appréciée pour ses qualités nutritives, sa résistance aux coupes successives et sa tolérance à la dessiccation et à la salinité. La taille réduite de ses plantules facilite, également, leur culture *in vitro* en conditions bactériologiques contrôlées.

**Dans ce travail, nous nous sommes proposés :**

- d'étudier l'établissement de la symbiose entre *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii et le Bersim,
- d'évaluer le potentiel symbiotique des sols d'Algérie vis-à-vis de cette légumineuse,
- de collecter et de caractériser les souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii associées au bersim.

## **Chapitre II Matériel et méthodes**

---

---

## 1- Matériel

### 1-1 Matériel végétal

Pour cette étude de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse nous avons retenus comme matériel végétal le Bersim (*Trifolium alexandrinum* L.). Deux variétés de cette légumineuse ont été utilisées, Nungarin et Tigri.

Les semences ont été calibrées par tamisage. La classe de taille la plus représentative a été retenue (0,8-1,2 mm) pour la variété Nungarin et (0,6-1,0 mm) pour la variété Tigri.

Les graines endommagées, malformées ou anormalement pigmentées ont été éliminées pour homogénéiser le lot afin de réduire la variabilité de notre matériel végétal.

pour la réalisation des tests d'inoculation croisée, nous avons également utilisé des semences de luzerne (*Medicago sativa* L. cv Mireille) et de lentille (*Lens culinaris* Medik. var Royale), l'une provien de l'ITGC (Institut de Technologie des grandes cultures-Alger) et l'autre est commerciale.

### 1-2 Milieux de culture

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé une série de milieux de culture convenant à chaque expérience.

#### 1-2-1 Milieu minéral pour la culture des légumineuses

Le milieu utilisé pour la culture,, in vitro,, du Bersim est le milieu minéral de Fahraeus (Vincent, 1970) (annexe 1).

#### 1-2-2 Milieu pour la culture des *Rhizobium*

Pour la culture et la conservation à court terme des souches de *Rhizobium*, nous avons utilisé le milieu Yeast Extract Mannitol YEM (Vincent, 1970) (annexe 2).

#### 1-2-3 Milieux pour la caractérisation des souches

Pour les tests effectués en microgalerie nous avons été amenés à modifier légèrement la composition du milieu YEMB et les modalités de sa préparation. Ces modifications portent sur une réduction de sa teneur en extrait de levure à  $0,1\text{g.L}^{-1}$  ainsi qu'en l'addition de  $0,1\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  afin de conférer un léger pouvoir tampon au milieu.

En ce qui concerne les modalités de préparation, la modification apportée consiste en la stérilisation par microfiltration à  $0,45\mu\text{m}$  de la base liquide YEMB (à double concentration) et ajout extemporané, en conditions stériles, d'un volume égal d'une solution à  $12\text{g.L}^{-1}$  d'Agar en surfusion, préalablement stérilisée par autoclavage à  $110^\circ\text{C}$ .

Lorsque le test projeté, le permet, un indicateur de pH, Le bleu de bromothymol ( $\text{pH}6-7,6$ ) est ajouté au milieu avant sa solidification pour permettre, le cas échéant de corriger le pH initial du milieu de culture par addition de fractions de  $10\mu\text{l}$  de solutions d'HCl ou de KOH 10N stériles.

#### 1-2-4 Milieu de conservation

Pour la conservation des souches à moyen et à long terme, nous utilisons le milieu de cryo-conservation (annexe 2).

#### 1-3 Souches bactériennes

En plus des souches extraites par nos soins, nous avons utilisé dans le cadre de cette d'étude 6 autres souches de *Rhizobium*, à savoir :

- une Souche de *R. leguminosarum* biovar trifolii de la collection de souches de *Rhizobium* du Laboratoire de Biologie du Sol : La souche CLBS-107 isolée en 1996 à partir des nodosités d'un plant de Bersim prélevé sur la station expérimentale de l'ITGC de Oued Smar. Cette souche a été retenue pour l'étude préliminaire sur l'établissement et l'expression de la symbiose chez le Bersim.

- six souches de référence se répartissant comme suit:
  - deux souches de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* la souche ATCC2376 et TA1,
  - deux souches de *R. leguminosarum* biovar *viciae*; les souches RCR3622 et SU391,
  - deux souches de *Rhizobium (SinoRhizobium) meliloti* USDA1002 et SU47.

Ces souches, très répandues dans les laboratoires de rhizobiologie, nous ont été fournies par la collection de souches rhizobiennes de l'USDA (United States Department of Agriculture, Arlington Research Station, USA).

## 2- Méthodes

### 2-1 Stérilisation superficielle des semences

Pour obtenir *in-vitro* des plantes axéniques, nous procédons systématiquement à la stérilisation de la surface des semences avant leur utilisation.

Cette stérilisation de la surface des graines est assurée par immersions successives de celles-ci dans les bains suivants:

- éthanol à 95° durant 30 secondes,
- solution de chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$  à  $1\text{g.L}^{-1}$  additionné de 5ml d'HCl concentré), pendant 3 minutes,
- quatre bains successifs d'eau distillée stérile afin de débarrasser le semences des traces de  $\text{HgCl}_2$

Les semences ainsi traitées sont ensuite mises à imbiber dans une boîte de Pétri stérile contenant de l'eau physiologique (0,85% de NaCl) pendant 3 heures. Après imbibitions, les semences sont ensuite mises à germer en pots sur échantillon de sol ou en conditions bactériologiques contrôlées dans des tubes en verre contenant le milieu minéral liquide de Fahraeus et des billes en verre de différents diamètres.

Les pots et tubes contenant les germinations de Bersim sont placés à température ambiante sous un éclairage additionnel de 8000 lux avec un photopériodisme de 16 heures de jour et 8 heures de nuit.

## 2-2 Stratégies de constitution du soucier

Pour la constitution de la collection de souches de *Rhizobium* compétentes envers le Bersim, nous avons procédé de deux manières différentes:

- en recourant à l'extraction des souches à partir des nodosités des 37 légumineuses, appartenant à 21 espèces cultivées et spontanées, du genre *Trifolium* prélevées sur le terrain, méthode généralement utilisée par les Rhizobiologistes pour la constitution des collections de souche de *Rhizobium* (Vincent, 1970; Freire et Kooling, 1986; Somasegaran et Hoben, 1994). C'est cette méthode que nous désignerons par "**extraction**" dans le reste de cette étude.
- en "piégeant" à l'aide de la Bersim, au laboratoire et en pots, les *Rhizobium* présents dans un échantillon de sol. Pour cela 30 sols, pris à partir de régions différentes, ont été séchés à l'air libre et tamisés à 2mm mailles carrées avant leur utilisation. Après 5 semaines de végétation des plantes, nous avons procédé à l'extraction des souches à partir des nodosités formées sur le système racinaire des plantules. Cette méthode, inspirée de la technique de dénombrement des *Rhizobium* dans le sol sera désignée par "**piégeage**" dans la suite de ce manuscrit.

## 2-3 Extraction, isolement et purification des souches

Pour l'extraction, l'isolement et la purification des souches de *Rhizobium*, nous avons adopté les méthodes préconisées par l'International Biological Programm (Vincent, 1970).

### 2-3-1 Extraction

Elle est réalisée dans des conditions d'asepsie à partir d'un nodule dont la surface est préalablement stérilisée par immersion du nodule dans de l'éthanol à 95° pendant 30 secondes suivi par une immersion dans une solution de chlorure

mercurique (HgCl<sub>2</sub> à 0,1%) pendant 3 minutes. Le nodule est ensuite rincé dans 8 bains

successifs d'eau distillée afin d'éliminer les traces d'HgCl<sub>2</sub>, très toxique, qui peuvent compromettre la viabilité des *Rhizobium*.

Le nodule ainsi traité est écrasé à l'aide d'une tige en verre dans 0,5ml d'eau physiologique stérile, pour libérer les bactéroïdes qu'il renferme.

### 2-3-2 Isolement et purification

Le broyat ainsi obtenu est ensemencé dans les boîtes de Pétri contenant du milieu YEMA-CR. Après 3 à 5 jours d'incubation à 25°C, les colonies bactériennes, présumées appartenir au genre *Rhizobium*, reconnaissables par leur non-absorption du rouge Congo et leur aspect gommeux et translucide, sont isolées par repiquages successifs, sur milieu YEMA-CR.

### 2-3-3 Conservation des souches

Deux méthodes de conservation des souches bactériennes ont été mises en œuvre dans le cadre de cette étude:

- une conservation à long terme par congélation à -20°C en cryotubes. A cet effet un milieu dit de cryo-conservation, dont le constituant essentiel est un cryoprotecteur (Glycérol). Cette méthode permet de conserver les souches rhizobiennes sur de longues périodes de temps (4 à 10 ans),
- une conservation à court terme à 4°C en tubes à essai sur tranches de milieu YEMA incliné. Cette méthode est utilisée pour les "sous collections" de travail. Sous collections systématiquement renouvelées à partir de cryoconservats au moins une fois par an.

### 2-4 Test de nodulation

Pour l'authentification et l'évaluation des performances symbiotiques des isolats bactériens, nous avons eu recours au test de nodulation. Opération qui consiste à inoculer, en conditions

microbiologiques contrôlées, une plantule axénique, à l'aide d'une suspension cellulaire rhizobienne âgée de 48 heures obtenue en milieu YEMB (environ  $10^8$  cellules/ml).

#### 2-4-1 Mesure de l'activité nitrogénasique

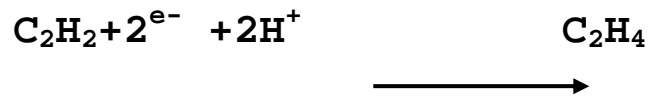
Pour la mesure de l'activité fixatrice d'azote des couples symbiotiques *Rhizobium*-légumineuses, nous avons retenu la technique de réduction de l'acétylène en éthylène et quantifier le dégagement de ce dernier par chromatographie en phase gazeuse (Stewart et al., 1967; Hardy et al., 1968). Cette méthode de mesure a été adoptée en raison de la simplicité de sa mise en oeuvre mais aussi en raison de sa grande sensibilité.

##### Principe:

La nitrogénase est peu spécifique vis à vis de son substrat car en plus de l'azote moléculaire, elle peut réduire un grand nombre de composés, parmi lesquels:  $C_2H_2$ , HCN,  $NH_3$ ,  $N_2O$ , ainsi que leurs homologues (Postgate, 1982).

La mise en évidence des propriétés de la nitrogénase, en particulier l'inhibition de la fixation d'azote par l'acétylène ( $C_2H_2$ ) et la réduction par la nitrogénase de ce dernier en éthylène ( $C_2H_4$ ) a amené Koch et Evans (1966) à proposer la mesure de la réduction de l'acétylène en éthylène pour l'évaluation de la fixation d'azote.

L'inhibition de la fixation d'azote par l'acétylène ( $C_2H_2$ ) et la réduction par la nitrogénase de ce dernier en éthylène ( $C_2H_4$ ) a été mise en évidence par Dilworth (1966) lors d'une étude sur la fixation d'azote par des extraits acellulaires de *Clostridium pasteurianum*.



Le principe de l'utilisation de cette méthode est relativement simple, il suffit pour évaluer l'activité nitrogénasique d'une légumineuse nodulée, d'enfermer celle-ci dans une enceinte étanche en présence de 10% d'acétylène et de mesurer au bout d'un certain temps le dégagement d'éthylène résultant de l'activité nitrogénasique de ses nodosités (Fig. 5).

Les mesures d'ARA sont effectuées sur les racines des lots de plantes représentant chaque essai. Les systèmes racinaires nodulés sont découpés juste avant l'incubation sous acétylène pour éviter d'altérer leur potentiel fixateur d'azote.

Les systèmes racinaires des lots de plantes de chaque essai sont placés dans un tube de type Vacutainer (15mm x 95mm) dont les bouchons assurent une étanchéité parfaite aux gaz. A l'aide d'une seringue, une quantité d'acétylène correspondant à 10% du volume des tubes à essai est introduite dans chaque tube. Après 1 heure d'incubation en présence d'acétylène, un échantillon de l'atmosphère du dispositif de mesure (5ml) est prélevé, stocké dans un petit vacutainer (12mm x 70mm) et une aliquote de celui-ci (0,1ml) est analysée par CPG.

#### **Etalonnage du chromatographe**

La chromatographie en phase gazeuse étant une méthode relative, il est nécessaire d'étalonner l'appareil avant chaque série de mesures. A cet effet, et avant chaque série de dosages, 0,5ml d'un mélange gazeux (1ml d'éthylène pur obtenu dans un flacon sérum de 1105 ml en présence de 200 ml d'air en

surpression) sont injectés à 3 reprises dans le chromatographe pour l'étalonner.

La hauteur moyenne du pic d'éthylène permet de déterminer la sensibilité relative du chromatographe à l'éthylène. En effet dans le cas de la technique de réduction d'acétylène en éthylène, la hauteur du pic de l'éthylène est directement proportionnelle à sa surface (Stewart et al., 1967; Hardy et al., 1968). Le contenu en éthylène de chaque essai est déterminé par simple extrapolation de la hauteur de son pic éthylène.

Lorsque l'échantillon analysé est très riche en éthylène, nous atténuons le signal issu du détecteur pour maintenir le chromatogramme dans les limites de l'enregistreur. Dans ce cas la teneur de l'échantillon en éthylène, déterminée par extrapolation, est multipliée par le facteur d'atténuation du signal.

La chromatographie en phase gazeuse permet de mesurer la vitesse de dégagement d'éthylène qui résulte de la réduction de l'acétylène par la nitrogénase. C'est cette vitesse qui est exprimée en nanomoles d'éthylène produit par heure et par plante ou par nodule (nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante ou nodule) que nous désignons par activité nitrogénasique, activité fixatrice d'azote ou encore activité réductrice d'acétylène (ARA).

**Il est nécessaire d'exprimer l'activité nitrogénasique par la quantité d'éthylène produite car le facteur de conversion entre l'activité réductrice de l'acétylène et la fixation d'azote, théoriquement égal à 4, peut varier considérablement d'un couple symbiotique à l'autre (Bergersen, 1970; Hardy et al., 1973; Martensson et Ljunggren, 1984).**

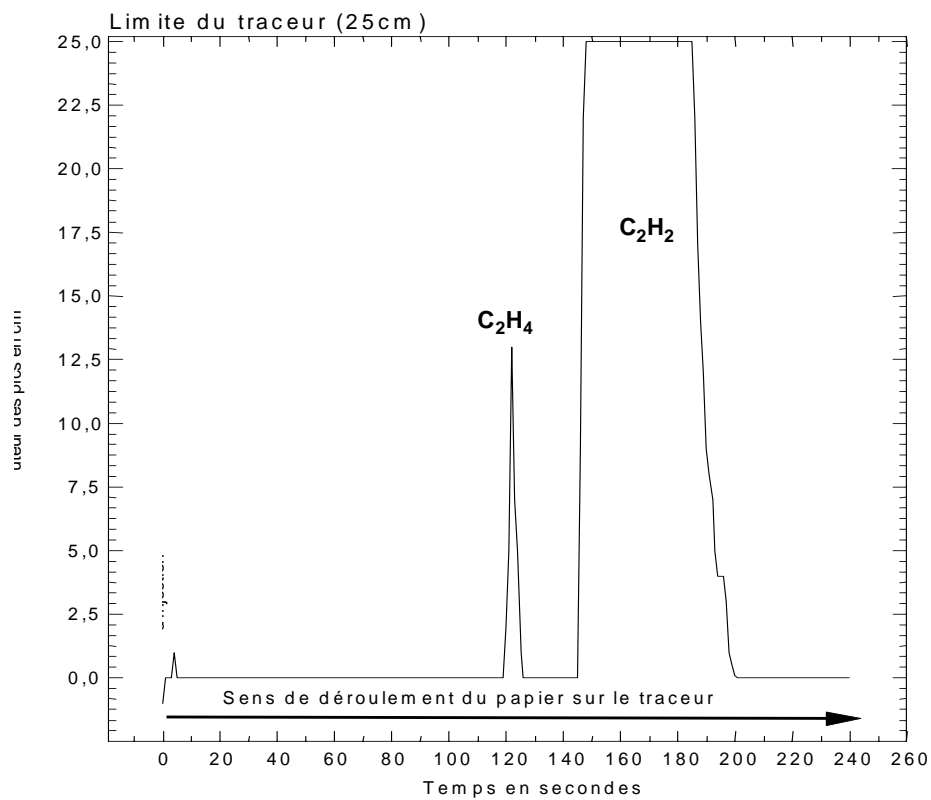
Le chromatographe en phase gazeuse, que nous avons utilisé est de marque Carlo Erba type Fractovap 4200 équipé d'un

détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne en acier de 2m de long et 1/8 de pouce de diamètre. La phase stationnaire est constituée de Spherosil XOB-80-100 mesh imprégné de 10% de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ .

Les paramètres expérimentaux permettant une bonne résolution de l'acétylène et de l'éthylène sont ceux précédemment définis par Amrani (1988) et Kaci (1988).

Tableau résumant les paramètres opératoires utilisés pour la mesure de la réduction de l'acétylène par CPG

<b>Paramètres</b>	
	<b>Température</b>
Four	80°C
Injecteur	100°C
Détecteur	100°C
	<b>Débits gazeux</b>
<b>Phase mobile</b> : azote	35ml/mn
<b>Flamme du FID</b>	
Air	300ml/mn
Hydrogène	30ml/mn



**Figure 10** : chromatogramme (CPG) type montrant les pics d'élution de l'éthylène ( $C_2H_4$ ) et de l'acétylène ( $C_2H_2$ ) au travers d'une colonne en acier inoxydable (diamètre 1/8 de pouce x 2m de long) remplie de Spherosil XOB (80-100 mesh) imprégné par 10% de  $Na_2PO_4$ .

## **2-5 Techniques d'inoculation**

Pour l'étude préliminaire sur l'établissement et l'expression de la symbiose, nous avons utilisé des plantules de la variété Tigri et la souche de *R. leguminosarum* biovar trifolii LBS-107. Toutes les expérimentations de cette section ont été réalisées en gros tubes à essais en utilisant des billes de verre de différent diamètre comme support physique et le milieu minéral de Fahraeus comme solution nutritive. Sept (07) tubes renfermant 3 plantes chacun (21 plantes) ont été prévues.

### **2-6-1 Taille de l'inoculum**

L'effet de la taille de l'inoculum bactérien sur la nodulation chez le Bersim a été déterminé 36 jours après l'inoculation des plantules à l'aide d'inoculums de taille variable.

### **2-6-2 L'âge de l'inoculum**

L'effet de l'âge de l'inoculum (durée de culture) a été déterminé par inoculation des plantules de Bersim de même âge avec des suspensions bactériennes d'âge différent.

### **2-6-3 L'âge de la plante hôte**

L'effet de l'âge de la plante hôte (date d'inoculation après germination des graines) sur l'établissement de la symbiose a été déterminé 36 jours après l'inoculation de plantules de Bersim.

## **2-6 Etablissement de la symbiose**

Pour suivre l'établissement de la symbiose chez le Bersim, nous avons inoculé des plantules avec la souche LBS-107 et suivi l'évolution de la nodulation et de l'activité nitrogénasique durant 43 jours.

Deux séries différentes ont été réalisées :

- la première pour le suivi de la nodulation et de la fixation d'azote,
- la seconde pour la détermination de l'effet de la symbiose sur la croissance de la plante et ce pour éviter de réaliser les mesures biométriques sur des plantes régulièrement soumises à des incubations assez longues sous atmosphère riche en acétylène.

### **3- Détermination des caractéristiques des souches de *Rhizobium***

Nous avons utilisé pour la détermination du profil phénotypique de nos souches, la méthodologie préconisée par l'American Society for Microbiology (Smibert et Krieg, 1984). Cette méthodologie qui insiste, entre autres, sur la qualité de la technique de conservation, le nombre de répétitions et l'importance des témoins non-inoculés permettent de déterminer des profils phénotypiques fiables et reproductibles.

Pour le choix des tests effectués, leurs modalités de mises en oeuvre, la concentration du milieu en substrat carboné ou en agent anti-bactérien. Nous nous sommes basés sur les travaux de Smibert et Krieg (1984), Lindstrom (1995) et les travaux de Holmes et al., (1986) et de Novikova (1994) incontournables en la matière.

#### **Le système Micro-Galerie**

Les tests retenus ont été réalisés pour leur grande majorité en microgaleries, adaptées aux besoins expérimentaux, au laboratoire de biologie du sol. Le système mis au point, consiste en l'utilisation de plaques de microtitration à 96 puits. Nous plaçons dans chacun des puits 0,15ml de milieu YEMA semi-solide ( $6\text{g.L}^{-1}$  d'Agar Agar).

Les puits sont ensemencés à l'aide de suspensions bactériennes obtenues après centrifugation et remise en suspension, dans de l'eau physiologique stérile, de cultures âgées de 72h. Nous utilisons pour l'ensemencement des cures-dents pour éviter l'apport d'une trop grande quantité d'inoculum.

Ne disposant pas d'un lecteur de plaques, nous avons eu recours pour la lecture de nos tests à deux méthodes:

- l'utilisation d'un indicateur de pH, en l'occurrence le Bleu de Bromothymol à 1,2%. Cet indicateur de pH (6-7,6), vert à la neutralité vire rapidement au jaune ou au bleu en cas d'acidification ou d'alcalinisation du milieu consécutivement à la croissance bactérienne. Tout virage coloré du Bleu de bromothymol, que ce soit vers le jaune et le bleu est traduit comme réaction positive. L'absence de virage coloré est lue pour sa part comme réaction négative. Pour chaque test, un témoin : non ensemencé est prévu. Celui-ci permet de juger de la stérilité du système microplaque mais également de repérer tout changement intempestif de la coloration du milieu qui ne soit pas occasionnée par la croissance bactérienne,

- Lorsque le milieu de base est coloré (tests de résistance aux colorants) ou que la coloration au Bleu de bromothymol ne convient pas pour détecter la croissance (expérience pH), nous procédons à une recherche à l'œil nu ou à la loupe de microcolonies à la surface ou au sein du milieu avant de décider de la positivité ou de la négativité de la réaction.

Le système mis au point présente de nombreux avantages par rapport aux galeries dites classiques (réalisées en tubes à essais): Economie de temps, économie de réactifs, économie d'espace notamment pour l'incubation en étuve bactériologique.

Les tests qui ont été réalisés sur nos souches ont consisté en la détermination :

#### **□ des caractéristiques coloniales**

Celles-ci ont été déterminées en boîtes de Pétri sur milieu YEMA et milieu YEMA-CR. Il s'agit de la taille des colonies, leur élévation, leur contour, leur aspect, leur pigmentation et leur réaction colorée sous éclairage UV ondes courtes.

#### **□ des caractéristiques cellulaires**

- Réaction de Gram selon la méthode modifiée de Vincent (Vincent, 1970)
- Morphologie, taille et mobilité des cellules bactériennes
- ..... Recherche de spores et de capsules respectivement par les méthodes Duguid et Shaeffer-fulton (Smibert et Krieg, 1984),
- Recherche de granules de poly-B-hydroxybutyrate selon la méthode de Burdon (Smibert et Krieg, 1984).

**□ des caractéristiques physiologiques et biochimiques**

- Recherche de l'activité catalasique par la méthode à l'eau oxygénée à 10 volumes (Smibert et Krieg, 1984)
- Recherche de l'activité oxydasique par la méthode de Kovacs (Smibert et Krieg, 1984)
- Recherche de la production d'H<sub>2</sub>S selon la méthode de Hunter et Crecelius (Smibert et Krieg, 1984).
- Recherche de la mobilité à basse et haute température (10°C et 30°C) en milieu mannitol-mobilité (Smibert et Krieg, 1984).

Les autres tests physiologiques et biochimiques, réalisés en micro-galeries, ont consistés en la détermination:

**□ de caractéristiques physiologiques diverses**

- Croissance à 5°C et 37°C
- Croissance à pH5 et à pH9
- Croissance en présence de NaCl (0,5, 1 et 2M)
- Croissance en présence de KCl (0,5M, 1 et 2M)

**□ du profil d'utilisation des hydrates de carbones**

De nombreux sucres ont été utilisés : monoses, dioses, polyols ainsi que des acides aminés et des acides organiques.

**□ du profil de résistance à différents agents antibactériens:**

antibiotiques, colorants et métaux lourds.

La liste exhaustive des tests réalisés figure en annexe XVI

**3-1 Mesure de la croissance**

**Pour l'évaluation de la croissance de nos souches, nous avons eu recours à deux méthodes:**

- le dénombrement des cellules viables (UFC) en milieu YEMA sur boîte de Pétri
- la mesure de la biomasse protéique cellulaire à l'aide de la technique de Bradford (1976) (annexe 3).

**3-2 Mesure de la production des EPS**

Pour le dosage des sucres totaux nous avons retenu la méthode à l'antrone sulfurique (Hanson et Philips, 1984) (annexe 4).

**4- Traitement statistique**

Les expérimentations réalisées dans le cadre de notre travail ont été réalisées en 5 et 7 répétitions suivant le cas Pour le traitement statistique de nos résultats (écart type, variance, comparaison de moyennes, analyse de variance, régression linéaire et corrélation...) De même que pour la réalisation de nos graphes nous avons utilisé les fonctionnalités du logiciel "MicroCal Origin" version 4 (Microcal Inc. 1993).

**5- Taxonomie numérique**

**Les techniques modernes de taxonomie numérique sont actuellement les méthodes de classification qui permettent de visualiser la structure de la variabilité phénotypique ou génotypique à l'aide de diverses représentations graphiques, comme les dendrogrammes ou les projections en deux ou trois dimensions.**

**5-1 Définition et principe**

La taxonomie numérique est une méthode de classification et d'étude des relations phénétiques basée sur le principe de la similitude globale d'organismes examinés pour un grand nombre de caractères (Sneath 1974).

Plus le nombre de caractères pris en considération est élevé plus l'efficacité du traitement est grande. On considère qu'avec environ une centaine de caractères significatifs et diversifiés on obtient une image du génotype et une classification plus précise que celles obtenues par les méthodes génomiques souvent restreintes à de faibles portions du génome (Lindstrom, 1995; Sneath, 1995; Gest 1999).

#### 5-2 Indice de similitude

La première phase du traitement numérique des profils phénotypiques est la détermination du coefficient de similitude entre les souches. De nombreuses formules permettent de réaliser cette opération, la plus utilisée en microbiologie est sans conteste celle de Jaccard.

Cette formule permet de calculer des indices ou coefficients de similitude entre les souches incluses dans le traitement. Ces indices permettent la construction d'une matrice de similitude qui servira de base pour la représentation graphique de la classification des souches examinées.

#### 5-3 Hiérarchisation et représentation graphique (Clustering)

A partir de la matrice de similitude, les souches sont regroupées selon leurs affinités, opération qui permet de définir des groupes (clusters) ou phénons polythétiques. Ces phénons sont ensuite hiérarchisés selon leur niveau de similitude. Le résultat de cette hiérarchisation est représentée par un dendrogramme ou "arbre" comportant des branches et rameaux représentant les souches et une échelle représentant la distance phénotypique entre ces derniers.

Nous avons utilisé pour la clusterisation de nos souches l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Mean Using Arithmetic Average) qui attribue à tous les caractères pris en considération la même valeur taxonomique (Sneath et Sokal, 1973).

Pour le traitement numériques des profils phénotypiques , nous avons utilisé deux logiciels:

- ❑ **Freak (Version 3 - juillet 1993)** - un logiciel permettant de réaliser des synthèses sur l'occurrence des caractères dans une matrice binaire
- ❑ **MVSP (version 3,13a - Kovach Computing Services 2002)** - un logiciel qui permet de produire les matrices de similitudes et la représentation graphique de la hiérarchisation des phénomènes.

# **Chapitre I –Etude bibliographique**

---

---

## Etude bibliographique

---

### **1- Le macrosymbionte : les légumineuses et le Bersim**

Le bersim ou trèfle d'Alexandrie fait partie du genre *Trifolium* L., famille des légumineuses. Un groupe de plante très important pour le fonctionnement de la biosphère en raison de leur capacité à fixer et réduire l'azote moléculaire. Selon Hansman (1989), près de 90% des espèces de la famille des légumineuses seraient capables de contracter des symbioses fixatrices d'azote.

Les légumineuses ou *Fabaceae* constitue l'une des plus grandes familles des plantes à fleurs très répandues dans la nature. Pour le nombre élevé d'espèces, environ (18000) qu'elle renferme, elle occupe la troisième place après les Orchidées et les Composées (Sprent, 2001). Ses représentants herbacés et ligneux affectionnent des habitats diversifiés (Raven et al., 1989). Cette famille est composée de **750 genres** comporte de nombreuses plantes (lentille, trèfle, luzerne, haricot, fève, soja, arachide, lupin, acacia, mimosa...) présentant un intérêt considérable pour l'alimentation humaine, les industries agroalimentaires, la foresterie, l'horticulture.

Le genre *Trifolium* L renferme 248 espèces pérennes et annuelles qui sont localisées dans trois zones du monde; l'Eurasiatique, l'Afrique du sud et l'Amérique (Taylor et al., 1990). En Algérie, le genre *Trifolium* est représenté par 37 espèces endémiques du pays et/ou de la méditerranée (Quezel et Santa, 1962).

Les trèfles cultivés sont exclusivement utilisés pour l'alimentation animale sous la forme de pâture, d'ensilage ou de fourrage. Des espèces comme *T. repens*, *T. pratense*, *T. ambiguum*, sont cultivées à grande échelle en Australie, aux USA et en Europe comme plantes fourragères (Allen et Allen, 1981).

Dans la région méditerranéenne, particulièrement dans sa rive sud, la culture du Bersim est prédominante voire exclusive comme c'est le cas en Algérie (Taylor, 1985; Hamadache, 1998).



**Figure 1** : plants de Bersim au stade floraison sur microparcelle à la station de l'ITGC de Oued Smar (Alger)



**Figure 2** : forme et organisation des feuilles de Bersim situées immédiatement en dessous de l'inflorescence, (I) inflorescence, (F) feuille trifoliolée.

Le Bersim est une espèce originaire d'Égypte. C'est une plante qui se développe en touffe grâce à ces axes plagiotropes et orthotropes qui se terminent par une inflorescence jaunâtre ou blanchâtre (planche 1) (Allen et Allen, 1981). Il est apprécié pour sa productivité, son intégration facile dans une rotation avec les céréales et pour son potentiel de régénération qui font que les plantes peuvent résister à des coupes successives (Hamadache, 1998).

Utilisé comme fourrage vert ou réduit en farine, le Bersim est cultivé intensivement au Nord de l'Algérie, particulièrement dans les zones d'élevage bovin, comme système fourrager simple pouvant assurer l'affouragement du cheptel bovin en aliment de qualité.

Le Bersim est plus apprécié dans le nord du pays que la luzerne en raison du caractère annuel de son cycle végétatif. Cycle qui permet d'envisager des rotations culturales rapides, contrairement à la luzerne (*Medicago sativa* L.) dont le cycle végétatif est plus long (bisannuel ou trisannuel).

## **2- Le microsymbionte : le *Rhizobium***

Le partenaire microbien de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse est une bactérie appartenant au genre *Rhizobium*, qui constitue avec *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Phyllobacterium* la famille des *Rhizobiaceae* sous-classe des *alpha-protéobactéries*. Les *Rhizobium* sont des bactéries Gram- de forme bâtonnet courts et arrondis à leurs extrémités, généralement mobiles. Ces bactéries sont aérobies, chimiotrophes et hétérotrophes.

Les *Rhizobium* ne présentent aucune caractéristiques culturales, morphologiques ou physiologiques, permettant de les distinguer des autres bactéries du sol (Elkan, 1992 ; Pieterneel et Vanderleyden, 1995).

Leur reconnaissance et leur classification demeurent essentiellement basées sur la propriété d'établir la symbiose avec des plantes hôtes spécifiques (Elkan, 1992). En effet,

une souche de *Rhizobium* ne peut pas infecter et noduler indifféremment n'importe quelle espèce de Légumineuses. En effet, une souche qui nodule le trèfle est incapable de noduler par exemple la luzerne (*Medicago sativa* L.) ou le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et inversement.

Cette propriété a permis de définir des groupes dits «d'inoculation croisée» (Elkan, 1992), c'est à dire des ensembles renfermant des souches capables d'infecter et de noduler un groupe de légumineuse et incapable de le faire avec d'autres groupes de légumineuses.

Les plus connus de ces groupes d'inoculation croisée ont été élevés par Jordan (1984) au rang d'espèces, repartis sur deux genres différents ; *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

**Tableau I** : récapitulatif des premières espèces de bactéries symbiotiques de *Rhizobiaceae* et leurs plantes hôtes, décrites par (Jordan, 1984)

Genre	Espèce	Sous espèce ou biovar	Plante hôte
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	-	Soja( <i>Glycine max</i> )
<i>Rhizobium</i>	<i>Rleguminosarum</i>	trifolii	<i>Trifolium spp.</i>
		phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot commun)
		viciae	<i>Vicia spp., Lathyrus spp., Pisum spp et Lens spp.</i>
	<i>R. meliloti</i>	-	<i>Medicago spp., Melilotus spp et Trigonella spp.</i>
<i>R. loti</i>		-	<i>Lotus spp.</i>

Les espèces *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium loti*, renferment souches peu connues jusque là et désignées dans la

précédente classification du genre *Rhizobium* (Jordan et Allen, 1974) respectivement par ***Cowpea group Rhizobia*** et ***Lotus group Rhizobia***.

Bien que la spécificité de l'interaction symbiotique est le critère de base de la reconnaissance des *Rhizobium*, leur classification est en pleine évolution avec l'extension des études sur des souches provenant de légumineuses de régions géographiques pour lesquelles les données étaient rares voire inexistantes jusqu'ici (Afrique, Amérique du Sud, la Chine...) (Martinez-Romero, 1995). Par ailleurs, les techniques de la biologie moléculaire ont permis de réexaminer la classifications des *Rhizobium* (De Lajudie et al., 1998; Velasquez et al., 2001; Young et al., 2001).

La découverte récente des gènes *nod ABC*, jusqu'ici considérés comme exclusifs aux *Rhizobium*, chez une *B-protéobactérie* (genre *Bulkhorderia*) (De Los Santos et al., 2001 ; Moulin et al., 2001), ainsi que la capacité nodulatrice des souches du genre *Methylobacterium* (Sy et al., 2001) risque de remettre en cause sérieusement la classification et la phylogénie de ce groupe bactérien.

### **3- L'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses**

L'interaction symbiotique entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la formation d'un véritable organe spécialisé, siège des échanges symbiotiques le nodule ou nodosité. Cet organe parfaitement intégré à la plante, est généralement localisé sur les racines (nodules racinaires), mais il existe quelques légumineuses tropicales où ces nodules se situent également sur la tige (nodules caulinaires) comme ce le cas chez *Sesbania rostrata* (Dreyfus, 1988).

C'est seulement à l'intérieur de la nodosité que les *Rhizobium*, sous la forme différenciée de bactéroïdes, peuvent fixer l'azote moléculaire en ammoniac. L'ammoniac produit se retrouve dans le flux métabolique de la plante ou il est transformé en composés azotés organiques utilisables par celle-ci (acides aminés, amides, uréides...). En retour, la plante assure aux bactéroïdes un environnement physique, physico-chimique et chimique favorable à l'expression de leur pouvoir fixateur d'azote (substrats énergétiques, pression partielle en O<sub>2</sub>...).

La symbiose *Rhizobium*-légumineuses apparaît ainsi comme le couplage du pouvoir photosynthétique de la plante avec celui de la fixation d'azote du *Rhizobium* (Fig. 1).

### **3-1 Spécificité de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses**

L'établissement de la symbiose, en particulier la formation du nodule, est le résultat d'interactions plus ou moins spécifiques entre les deux symbiotes.

et la formation du nodule sont les résultats d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques. Ce dialogue généré dans le sol rhizosphérique implique la reconnaissance spécifique entre le *Rhizobium* et sa légumineuse hôte. Dans la rhizosphère, la plante exsude des substances nutritionnelles qualitativement et quantitativement variées, notamment des flavonoides, constituant le premier message aux bactéries *Rhizobium*.

**Le premier volet** de ces interactions est peu, voire pas spécifique. Il s'agit de la stimulation de la prolifération des *Rhizobium* n'étant pas très abondants dans le sol, la plante doit favoriser leur attraction et la multiplication au voisinage de ses racines pour assurer la nodulation (Dommergues et Mangenot, 1970; Blondeau, 1980; Lowendorf, 1980; Lemanceau et Heulin, 1998).

**Le deuxième volet** de l'interaction menant à l'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, est l'infection des racines et la formation du nodules. Cette étape, très spécifique, fait suite à un dialogue moléculaire très élaboré. La plante et le *Rhizobium* qui ont co-évolué longtemps ensemble (Gualtieri et Bisseling, 2000), ont développé un véritable système de signalisation et de reconnaissance moléculaires afin de vérifier leur compatibilité mutuelle.

A cet effet, la plante exsude en quantité infimes, des composés spécifiques, à savoir des **flavonoides** qui agissent comme signal déclenchant la cascade des événements menant à la formation du nodule (Fig. 3).

Lorsque ces flavonoides sont perçus par une souche de *Rhizobium* compatible, ils déclenchent chez celle-ci l'induction de l'expression des gènes de nodulation inactifs jusqu'ici (Van de Sande et Bisseling, 1997).

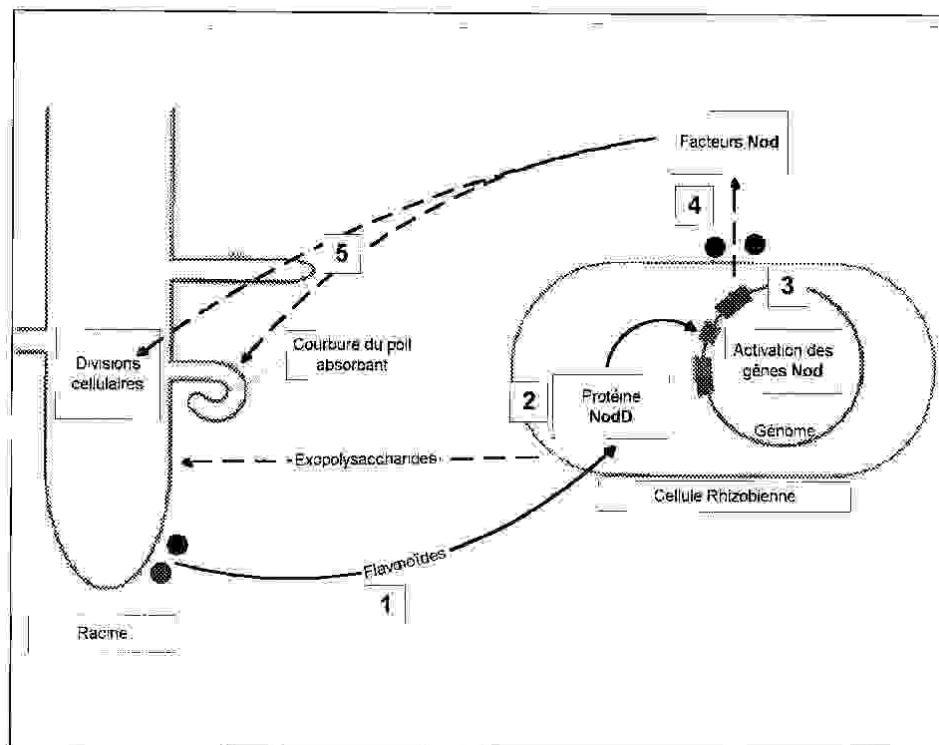
Ces gènes chromosomiques et/ou plasmidiques, sont responsables de la synthèses de substances de signalisation spécifiques à chaque espèce de *Rhizobium*.

Il s'agit de substances de nature lipo-oligosaccharidiques (LCO) appelés **Facteur Nod** (Fisher, 1994). Ces **facteurs Nod** sont représentés par une chaîne de N-acétyl-glucosamine associée à un acide gras dont la composition, en particulier les substitutions qu'il porte, détermine la compatibilité du *Rhizobium* vis-à-vis des légumineuses .

Les **facteurs Nod**, eux aussi produits à des concentration infimes, sont à leur tour perçus par la plante hôte dont les racines deviennent dès lors spécifiques à l'infection par le *Rhizobium*. Cette compétence se traduit par une atténuation du système de défense de hôte et de changements cytologiques et histologiques permettent la

**Figure 3** : représentation schématique des échanges de signaux moléculaires lors de l'initiation de l'interaction Rhizobium-légumineuses (schéma modifié de Day et al., 2000)

- 1- Exsudation de flavonoïdes spécifiques par la plante hôte
- 2- Perception des flavonoïdes par la protéine Nod D
- 3- Cette perception se traduit, lorsque les symbiotes sont compatibles, par l'induction des gènes *nod*
- 4- Synthèse par le Rhizobium des facteurs Nod spécifiques
- 5- Perception par la plante des Facteurs Nod et l'induction de la nodulation (courture du poil absorbant, formation du méristème nodulaire...).



**Figure 3** : représentation schématique des échanges de signaux moléculaires lors de l'initiation de l'interaction Rhizobium-légumineuses (schéma modifié de Day et *al.*, 2000)

- 1- Exsudation de flavonoïdes spécifiques par la plante hôte
- 2- Perception des flavonoïdes par la protéine NodD
- 3- Cette perception se traduit, lorsque les symbiotes sont compatibles, par l'induction des gènes *nod*
- 4- Synthèse par le Rhizobium des facteurs Nod spécifiques
- 5- Perception par la plante des Facteurs Nod et l'induction de la nodulation (courbure du poil absorbant, formation du méristème nodulaire...).

pénétration de la bactérie dans la racine , sa multiplication et son hébergement au sein d'une structure dédiée : le nodule dont les détails de l'ontogénie sont examinés plus loin (cf.3-2).

Les gènes *nod* qui représentent la clé de l'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse sont subdivisés en trois groupes :

- les gènes ***nod commun***, identiques chez tous les *Rhizobium* (Le Rudulier et *al.*, 1993). Ils sont représentés par les gènes *nod abc*, responsables de la formation du squelette N-acétyl glucosamine du **Facteur Nod** (Bladergroen et *al.*, 1998),
- les gènes ***nod spécifiques***, Représentés par les gènes déterminent la structure finale du facteur Nod , c'est à dire la nature de son acide gras et des substitutions de ce dernier (Van de Sande et Bisseling, 1998). C'est en fait La structure chimique du LCO qui détermine le spectre de plante hôte pour une souche donnée (Triplett et Sadowsky, 1992),
- les gènes ***nod régulateur*** sont responsables de la régulation de l'expression des gènes ***nod commun*** et ***spécifiques***. Ils codent pour la protéine NodD (Van de Sande et Bisseling, 1998). Cette protéine constitutive joue le rôle de récepteur spécifique des flavonoides émis par la légumineuse compatible (Fisher, 1994 ; Zeze et *al.*, 2001).

### **3-2 Formation du nodule**

Une fois que la compatibilité entre les deux symbiotes est vérifiée, la formation des nodosités peut avoir lieu. Celle-ci est schématisée classiquement en quatre phases distinctes qui ne rendent pas toujours comptes avec précision de la succession spatio-temporelle du grand nombre d'événements, souvent simultanés, que la formation du nodule fait intervenir

### 3-2-1 Reconnaissance spécifique

Cette phase fait intervenir, nous l'avons vu, un échange de signaux moléculaires dont les médiateurs principaux sont les flavonoides de la plante et les Facteurs Nod *Rhizobium*. Cette reconnaissance a pour objectif de permettre l'adhésion, vraisemblablement irréversible, des cellules bactériennes à la surface des racines de l'hôte (Perret, 1999; Sprent, 2001). Cette adhésion fait intervenir :

- du côté de la plante les lectines, des composés de nature glycoprotéine qui diffèrent d'une plante à l'autre (Spaink, 1993 ; Viprey et al., 2000),
- du côté du *Rhizobium*, vraisemblablement les exopolysaccharides qui diffèrent d'une espèce de *Rhizobium* à l'autre (Van de Sande et Bisseling, 1996 ; Viprey et al., 2000).

### 3-2-2 Infection du système racinaire

phase durant laquelle les *Rhizobium* pénètrent via le poil absorbant dans les cellules des racines hôte. Cette pénétration est facilitée par :

- l'allongement et le recourbement de l'extrémité distale du poil absorbant sous la forme d'une crosse dite « crosse de berger » qui enserme le *Rhizobium* rendant le contact bactérie-poil absorbant plus intime (Viprey et al., 2000),
- une fragilisation localisée de la paroi du poil absorbant sous l'effet d'enzymes hydrolytiques végétales (Ridge, 1992; Parniske, 2000; Viprey et al., 2000) .

Cette fragilisation s'accompagne par la formation d'une structure tubulaire appelée **cordon** ou **filament d'infection** qui permet la pénétration du *Rhizobium* et sa progression vers le **primordium nodulaire** dont la formation, déclenchée lors de la perception des facteurs Nod d'une souche compatible, est déjà là à nu stade avancé.

### 3-2-3 Nodulation proprement dite

Elle consiste en l'induction, par le Facteur Nod, chez la plante de la dédifférenciation de quelques cellules corticales en un méristème nodulaire (Geurts et Franssen, 1996). Les cellules de ce dernier se divisent intensément, donnant naissance à un primordium nodulaire site d'hébergement des *Rhizobium* acheminés par le filament d'infection dans lequel ces derniers se sont multipliés activement en cours de route.

C'est à ce niveau que les *Rhizobium* infectent les cellules du primordium en y pénétrant par un phénomène d'endocytose. A l'intérieur de ces cellules végétales dites cellules hôtes, les *Rhizobium* se multiplient activement. Les cellules bactériennes sont séquestrées individuellement ou par groupes par des systèmes membranaires d'origines végétales pour former des **symbiosomes**, l'unité fondamentale de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses (Elmerich, 1997; Parniske, 2000).

Cette compartimentation permet d'isoler les bactéroïdes du cytoplasme des cellules hôte afin d'y créer un environnement adéquat à l'activité de la la nitrogénase (Corzo et al., 1993), en particulier la protection de celles-ci vis-à-vis de l'oxygène qui la dénature irréversiblement (Hadker et al., 2001).

L'un des rôle principaux du nodule set de satisfaire les exigences contradictoires des composants de la symbiose vis-à-vis de l'oxygène. Les cellules végétales constituant le nodule et les bactéries que celui-ci renferme ont besoin de l'oxygène alors que la nitrogénase y est extrêmement sensible.

Pour régler se dilemme, les deux symbiotes ont su recourir à un moment de leur évolution à l'utilisation d'une molécule très proche de l'hémoglobine : la légghémoblobine. Une hémoprotéine dont la fraction protéique est synthétisée par la plante hôte et l'hème par le *Rhizobium* (Drevon et al., 1995). La légghémoglobine permet d'assurer l'approvisionnement des

bactéroïdes en oxygène sans altérer la nitrogénase (Hardison, 1999 ; Galtieri et Bisseling, 2000).

**3-2-4 La multiplication des cellules du primordium**, cette dernière étape se caractérise par une augmentation considérable du nombre et de la taille du primordium nodulaire. Elle se traduit par une augmentation du volume des tissus nodulaire et l'émergence du nodule à la surface de la racine.

De manière concomitante, les bactéries se divisent et se différencient en **bactéroïdes**, cellules dépourvues de paroi et beaucoup plus grandes que les cellules végétatives. Ces cellules Rhizobiennes transformées en bactéroïdes sont généralement ovoïdes mais peuvent prendre d'autres formes : raquette, X,Y,L...

Ce n'est que sous leur forme de bactéroïdes que les *Rhizobium* vont pouvoir synthétiser la « **Nitrogénase** », l'enzyme qui leur permet de fixer en réalité de réduire l'azote moléculaire.

#### **4- Structure du nodule**

Les nodules sont des structures qui se développent sur les racines et parfois sur les tiges. La coupe d'un nodule révèle l'existence de plusieurs tissus :

- **un tissu périphérique** formé par un cortex, un endoderme et des bandes vasculaires. Il délimite une zone centrale,
- **un tissu central** de couleur rose-rouge due à la présence de la légghémoglobine. Il est formé d'un ensemble de cellules végétales envahies par les *Rhizobium* (cellules hôtes).

Les tissus du nodule sont en continuum avec les tissus de la racine, permettant ainsi la connexion entre le métabolisme de la plante et celui du nodule (Schubert et al., 1984; Elmerish, 1997).

Sur la base de leur morphologie, leur structure et la durée du fonctionnement du méristème nodulaire, les nodules des légumineuses se subdivisent en deux catégories :

- **les nodules indéterminés.** Le nodule à structure indéterminée dont les tissus sont générés à partir des cellules des couches internes du cortex racinaire. Ce type de nodule présente un méristème nodulaire dont l'activité mitotique persiste après l'infection par le *Rhizobium*. Ce type nodulaire se présente sous une forme allongée et se retrouve généralement chez les légumineuses des régions tempérées (trèfle, luzerne, pois, lentille...).
- **les nodules déterminés.** Les nodules à structure déterminée dont les tissus sont générés à partir des cellules des couches externes du cortex racinaire. Ce type nodulaire possède un méristème dont l'activité mitotique s'arrête juste après l'infection par le *Rhizobium* formant ainsi des nodules sphériques rencontrés chez les légumineuses des régions tropicales ou originaires de celle-ci (soja, haricot...).

## 5- La fixation biologique de l'azote atmosphérique

contrairement au fixateur libres, c'est seulement à l'intérieur de la bulle environnementale définie par le nodule que les *Rhizobium* peuvent fixer l'azote, c'est à dire produire et exprimer l'activité de l'enzyme clé de la fixation d'azote la **nitrogénase (EC 1.18.6.1)**. En effet, chez les *Rhizobium*, la synthèse et le fonctionnement de la nitrogénase sont largement contrôlés par la plante hôte (Hirsh et al., 1997).

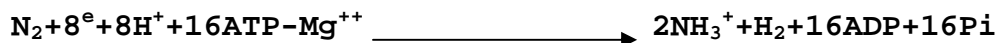
La nitrogénase ou complexe nitrogénasique est une hétéroprotéine (métalloprotéine) classée comme oxydoréductase (Kim et al., 1994).

Elle est synthétisée et régulée par un ensemble de gènes (chromosomiques ou plasmidique); gènes *nif* (synthèse) et les gènes *fix* (expression et régulation). La nitrogénase des *Rhizobium* est composée de deux protéines associées à quatre atomes de fer, quatre atomes de soufre et un atome de molybdène.

Elle se présente sous la forme d'un complexe renfermant deux composantes enzymatiques distinctes :

- la **dinitrogénase** (Mo-nitrogénase ou composant I), représentée par un tétramère protéique associé avec le molybdène, le fer et le soufre. C'est elle qui est responsable de la réduction de l'azote,
- la **dinitrogénase réductase** (composant II), représentée par un dimère protéique contenant du fer et du soufre. Elle assure le transfert des électrons, à partir d'un donneur (ferredoxine ou flavodoxine) vers la dinitrogénase

En présence d'énergie, le couplage du fonctionnement des deux composantes de la nitrogénase permet d'effectuer la réaction suivante :



Dans le cas de la symbiose, L'énergie nécessaire à la réduction de l'azote moléculaire est assurée indirectement par les photosynthétats natifs (sucre) ou convertis (acides organiques) de la plante via les vaisseaux qui irriguent le nodule (phloème).

La réduction de l'azote moléculaire s'accompagne par un dégagement d'hydrogène ( $H_2$ ), ce qui constitue une perte d'énergie (Drevon et Salsac, 1984). Certaines souches de *Rhizobium* appelées ( $Hup^+$ ) sont capables Grâce à une hydrogénase de recycler une partie de cette énergie en générant de l'ATP (Drevon et Salsac, 1980). Cette propriété est recherchée chez les souches de *Rhizobium* destinées à la production d'inoculum pour l'agriculture puisqu' elle réduit la facture d'énergie de la symbiose assurant ainsi des rendements plus élevés que ceux obtenus avec des souches ( $Hup^-$ ).

## **Chapitre III – Résultats et discussion**

---

---

## Résultats et discussion

---

### 1-Etablissement de la symbiose Rhizobium-Bersim.

La nodulation d'une légumineuse par une souche de *Rhizobium* dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement de la plante. C'est pour cette raison, que nous avons jugé judicieux d'étudier l'effet de certains d'entre eux sur la symbiose.

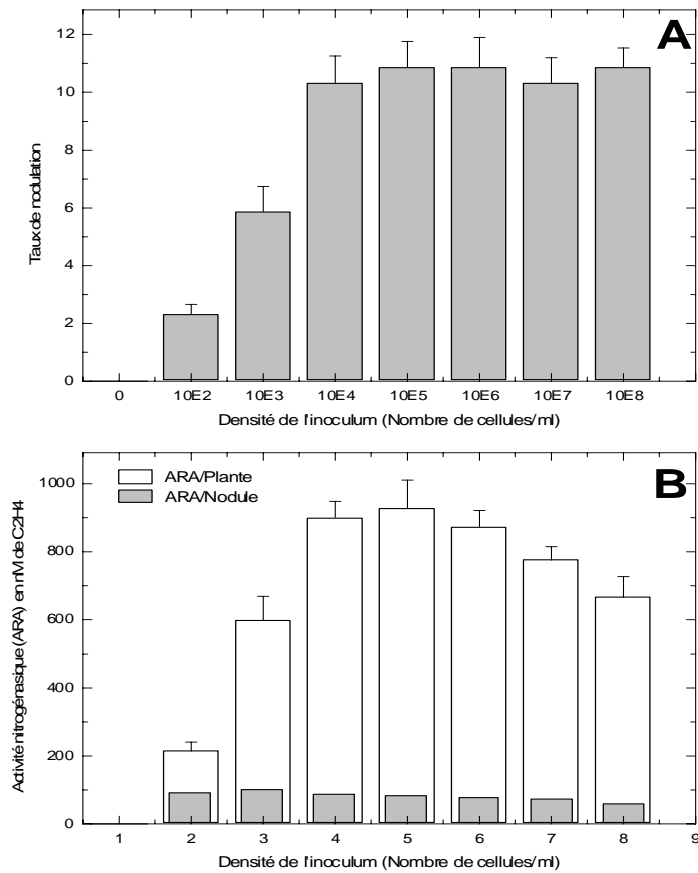
#### 1-2 Effet de la taille de l'inoculum sur la nodulation

Le taux de nodulation des plantes de *T alexandrinum* L var Tigri, inoculées avec un nombre croissant de la souche de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii LBS-107, semble être influencer .

Les résultats, *in vitro*, montrent que le taux de nodulation en présence de  $10^2$  cellules, avec environ 2 nodules, augmente pour atteindre 10 nodules/plante en présence de  $10^{E4}$  cellules/ml, au delà de cette concentration cellulaire, nous observons un plateau qui indique que la taille de l'inoculum n'a plus d'effet sur le taux de nodulation des plantules de Bersim.

Cette rupture de la proportionnalité entre la taille de l'inoculum et le taux de nodulation de du bersim indique qu'il existe une limite au niveau d'infection par le *Rhizobium*. Cette régulation par les légumineuses de leur degré d'infection par le *Rhizobium* ferait intervenir, d'après Schultz et Kondorosi (1998) et Mathesus et al. (2000) :

- une répression de la rhizogénèse comme semble l'indiquer par le ralentissement de la formation de nouvelles racines après la deuxième semaine de végétation.
- o des composés intervenant dans les réactions de défenses notamment l'acide salicyliques pour empêcher l'infection rhizobienne (Schultz et Kondorosi, 1998).



**Figure 6** : Effet de la taille de l'inoculum sur la nodulation (A) et l'activité nitrogénasique (B) des plantules de Bersim (variété Tigri) inoculées par la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii LBS107. (Chaque barre représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune, surmontée de son erreur standard)

- o un changement de la composition de la paroi des cellules végétales au niveau des points d'infection ou encore, qui sont les sites privilégiés pour la pénétration des *Rhizobium* dans la racine de l'hôte (Mateo et al., 2001).

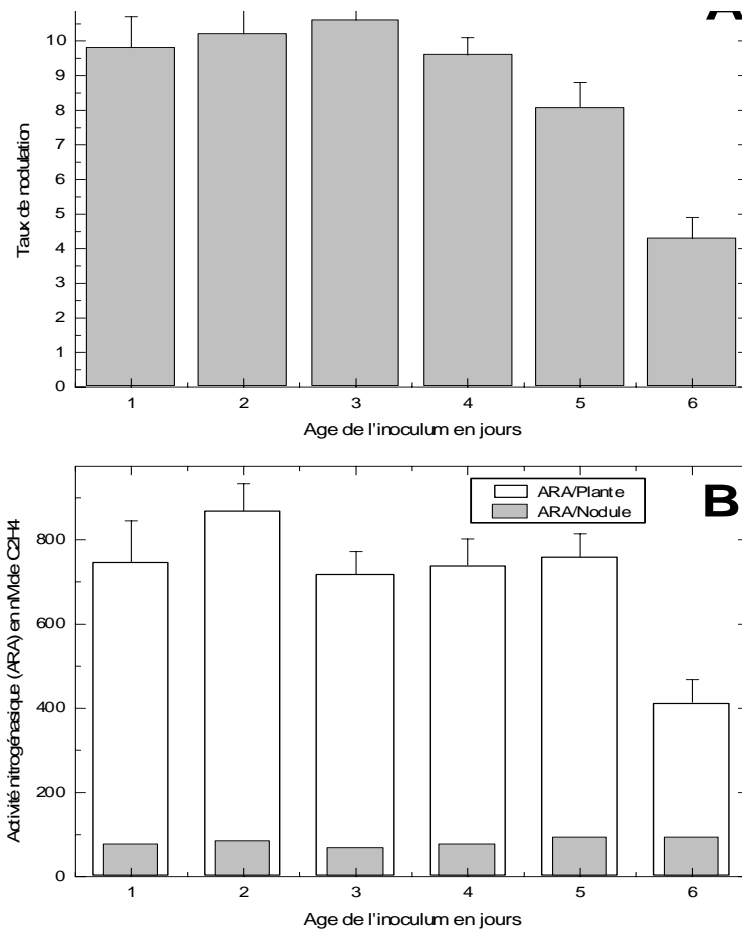
Nos résultats indiquent clairement que la nodulation optimale des plantes exige un seuil de représentativité des *Rhizobium* dans le milieu. Ce seuil se situe,, *in vitro*,, et dans nos conditions de travail à  $10^{E6}$  cellules/ml de milieu.

Les couples symbiotiques obtenus en présence des différentes concentrations cellulaires ont montré une activité nitrogénasique qui varie entre 214 et 927nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante. Variations qui s'expliquent essentiellement par des taux de nodulations dissemblables enregistrés d'une concentration cellulaire à l'autre.

Nous avons également observé des variations importantes de l'ARA nodulaire qui s'échelonne entre 60 et 100 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h respectivement en présence de  $10^{E8}$  et  $10^{E2}$  cellules rhizobienne/ml. Ces variations du niveau d'ARA nodulaire ne peuvent s'expliquer que par une différence de leur alimentation en substrats énergétique (Streeter, 1993). Lorsque le nombre de nodules est faible, la plante peut leur allouer plus de photosynthétats que lorsque ils sont plus nombreux (Gall et al, 1987). C'est pour cette raison que les niveaux d'ARA nodulaire les plus élevés ont été enregistrés avec les taux de nodulation les plus faibles

### **1-3 Effet de l'âge de l'inoculum**

L'âge des cellules Rhizobienne amenées dans le milieu par l'inoculum n'influe que dans une certaine limite sur la nodulation des plantules de bersim. Les taux de nodulation obtenus pour les inoculums âgés de 1, 2, 3 et 4 jours se sont révélés sensiblement similaires (9,6 à 10,6 nodules/plante). Ce n'est que pour les inoculums plus âgés (5 et 6 jours) que nous observons une diminution consistante du taux de nodulation des plantules qui passe à 8,1 et puis à 4,3 nodules par plante (Fig .7).



**Figure 7** : Effet de l'âge de l'inoculum sur la nodulation (**A**) et l'activité nitrogénasique (**B**) des plantules de Bersim (variété Tigri) inoculées par la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii LBS107. (Chaque barre représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune, surmontée de son erreur standard).

La réduction du taux de nodulation du bersim en présence d'inoculums âgés peut trouver son explication dans la réduction de la viabilité des cellules amenées par l'inoculum (Nazih et Weaver, 1994; Brockwell et Bottomley, 1995).

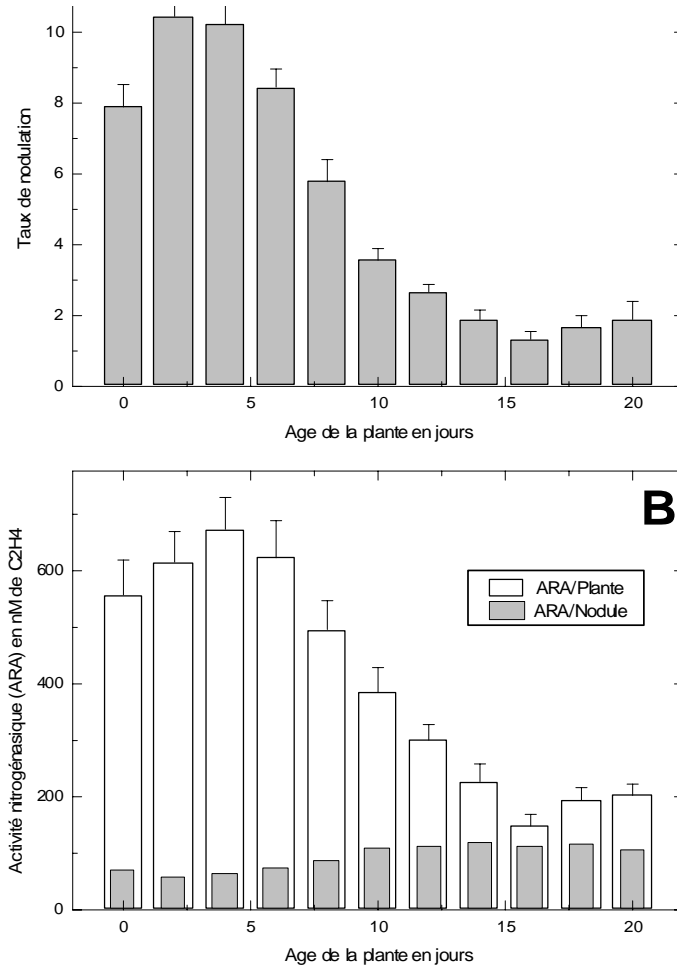
Les inoculums âgés, en raison de la dégradation des caractéristiques physico-chimique du milieu, renferment à volume égal moins de cellules viables que les inoculums jeunes.

Les couples symbiotiques obtenus en présence d'inoculums d'âge différent montrent une activité nitrogénasique qui varie de 414 à 869 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante. Les ARA nodulaire étant sensiblement similaires (75 à 95nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/Nodule) les variations de l'ARA plante reflètent le taux de nodulation des plantules.

#### **1-4 Effet de l'âge de la plante sur la nodulation**

L'âge de la plante, c'est à dire le moment où elle est inoculée semble avoir un effet sur le taux de nodulation de bersim. En effet, les taux de nodulation enregistrés varient entre 10,4 et 1,3 nodules/plante respectivement pour une inoculation effectuée 2 jours et 16 jours après la germination (Fig .8).

Les taux de nodulations les plus élevés ont été enregistrés lorsque les plantules sont inoculées à un âge inférieur à 5 jours. Au-delà de cette limite, les taux de nodulation se sont révélés nettement inférieurs.



**Figure 8** : Effet de l'âge de la plante sur la nodulation (A) et l'activité nitrogénasique (B) des plantules de Bersim (variété Tigri) inoculées par la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii LBS107. (Chaque barre représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune, surmontée de son erreur standard)

Résultats en accord avec les données de la littérature qui considèrent que la nodulation des légumineuses est plus importante lorsque l'inoculation est réalisée immédiatement après la germination (Montanez, 2000).

La réduction de la nodulation chez les plantes âgées résulterait de :

- La réponse chimiotactique des souches assurée par la qualité des exsudats racinaires de la plante hôte (Hartwing et al., 1991). En effet, la nature des substances libérées par la racine dans l'environnement rhizosphérique, notamment les flavonoides qui exercent un pouvoir attractif spécifique vis à vis des espèces voire souches de *Rhizobium* présentent au contact des racines de la plante (Van de Sande et Bisseling, 1997; Bergum et al., 2001).
  
- L'expression d'un des mécanismes de régulation de la nodulation par la plante hôte. Un mécanisme qui limite l'infection et la pénétration des *Rhizobium* dans la plante hôte (Knezek, 1997).

Ce résultat qui est en accord avec la littérature qui illustre l'importance de la présence en quantité suffisante de *Rhizobium* dès la mise en place d'une culture de légumineuse (Montanez, 2000). C'est pour cette raison qu'on procède de plus en plus à la bactérisation des légumineuses par enrobage de leurs semences plutôt que par leur aspersion après germination et levée du semis.

L'efficacité de la symbiose établie dans ces conditions et estimée en ARA/plante et, indique que l'activité nitrogénasique est à ses limites maximales lorsque l'inoculation est réalisée à un stade précoce de l'âge de la plante. En effet, elle varie entre 140 et 670nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante respectivement pour les plantules âgées de 2 et 16 jours. Par contre, le potentiel nitrogénasique semble être

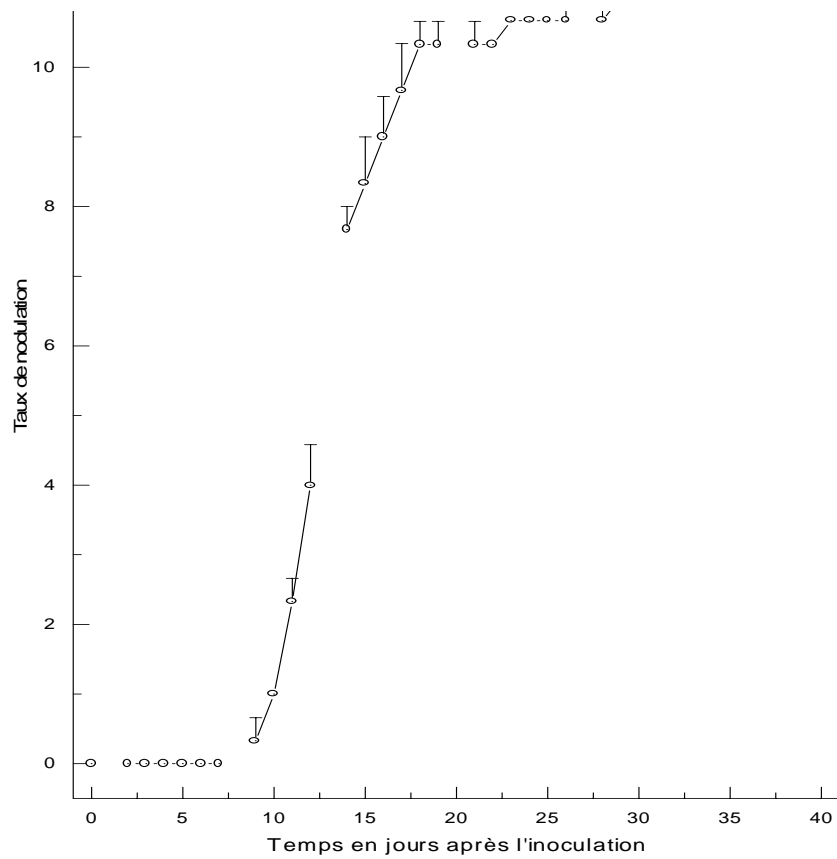
proportionnel à l'âge avancé des plantes inoculées. Les résultats enregistrés montrent que l'ARA par nodule s'échelonne entre 58 et 120nMde C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h, lorsque les plantes sont inoculées respectivement 2 et 16 jours après la germination.

#### **1-4 Etablissement de la symbiose (ontogénie)**

Les ébauches nodulaires sont visibles (à l'œil nu ou à la loupe) sur le système racinaire du bersim une semaine après leur inoculation (10 jours après la percée de la radicule). Ces ébauches sont de forme hémisphérique parfois difficilement distinguables des ébauches des racines secondaires (souvent coniques). Ces ébauches évoluent rapidement en nodules bien différenciés légèrement plus long que larges. Ces nodules sont de type indéterminé comme c'est le cas chez toutes les légumineuses susceptibles à *R leguminosarum* bv trifolii (Sprent, 2001 ) (Fig.9).

L'établissement de la symbiose entre le bersim et *R leguminosarum* bv trifolii apparaît donc comme un processus relativement rapide. On considère en effet, que chez les légumineuses annuelles, la nodulation est, *in-vitro* du moins, précoce puisque les ébauches de nodosités sont visibles au microscope ou à la loupe 10 à 12 jours seulement après l'inoculation. Ces ébauches nodulaires se développant par la suite rapidement pour devenir visibles à l'œil nu au bout de 12 jours après l'inoculation (Franssen et al, 1992).

Ces délais sont similaires à ceux observés dans des les mêmes conditions par Taguett (1998) chez la luzerne (*Medicago sativa* cv Mireille) et Haddadj (2002) chez la lentille (*Lens culinaris* Medic).



**Figure 9** : Evolution dans le temps de la nodulation des plantules de Bersim (variété Tigri) inoculées avec la souche LBS-107.  
 (Chaque barre représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune, surmontée de son erreur standard.)

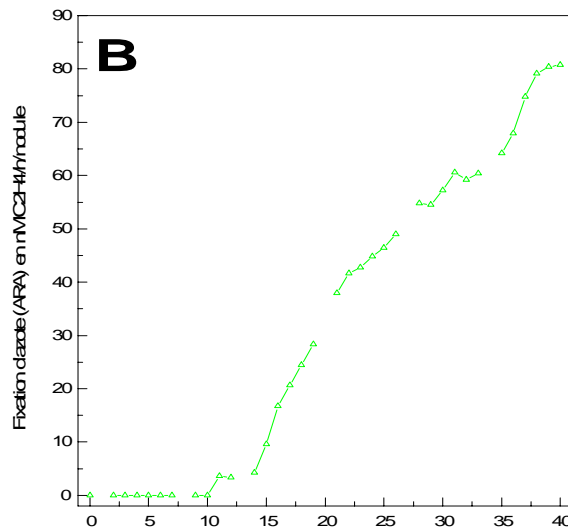
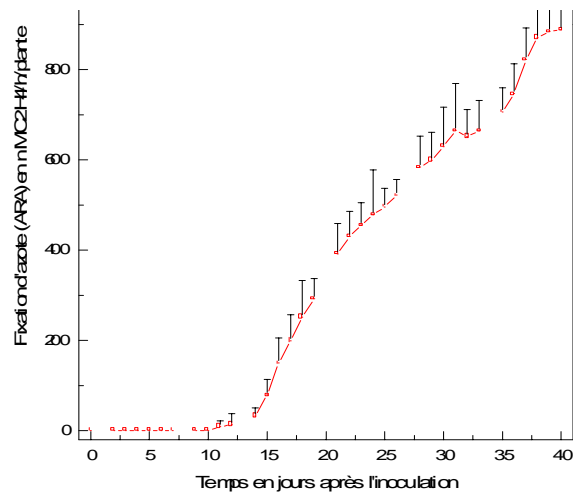
Initialement réduit avec 0,33 nodules/plante au 10<sup>ème</sup> jour, le taux de nodulation des plantules de bersim augmente régulièrement et parallèlement au développement du système racinaire de la plante hôte pour atteindre son niveau maximum 11 nodules/plante, 30 jours après l'inoculation et s'y maintient durant tout le reste de la durée de l'expérimentation (43<sup>ème</sup> jour). En effet, au-delà du 30<sup>ème</sup> jour de végétation, nous n'avons pas observé, chez les plantules l'apparition de nouveaux nodules.

Le profil d'évolution de la nodulation,, *in vitro*,,, que nous avons décrit ci-dessus pour les plantules de bersim et la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii LBS-107, est en accord avec les données de la littérature. Il est bien établi que l'essentiel des nodosités apparaît chez les légumineuses herbacées durant les premières semaines suivant l'inoculation qui coïncide avec les tissus jeunes la plante (Gualtieri et Bisseling, 2000). Avec l'âge de la plante, on assiste à une régression importante de la nodulation sur les racines devenues matures qui serait due à un manque de flavonoïdes inducteurs ou à une absence de la réponse des gènes de la nodulations chez les *Rhizobium* c'est à dire un problèmes lié à la transduction des signaux de la symbiose entre les deux partenaires (Mathesius et al, 2000).

#### **1-4-1 Expression de la symbiose**

Les nodosités formées sur le système racinaire de bersim ne sont capables de réduire l'azote moléculaire qu'à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de nodulation, comme l'indique l'évolution de l'activité réductrice de l'acétylène. L'ARA n'est notable chez les couples symbiotiques testés qu'au 14<sup>ème</sup> jour de la croissance des plantes (Fig .10 ).

Initialement réduite au 14<sup>ème</sup> jour de végétation, l'efficience des plantules de de bersim subi une augmentation régulière pour atteindre son maximum au 38<sup>ème</sup> jour de végétation avec une ARA de 900nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante et se stabilise autour de cette valeur jusqu'à la fin de l'expérimentation.



**Figure 10** : Evolution dans le temps de l'activité nitrogénasique (ARA) des plantules (**A**) et des nodules (**B**) chez le Bersim inoculé avec la souche LBS-107. (Chaque barre représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune, surmontée de son erreur standard).

L'intensification du potentiel nitrogénasique des plantules de bersim dans le temps, serait en relation avec:

- o L'augmentation du nombre de nodule dont l'apparition se poursuit jusqu'au 28ème jour de végétation et qui peut être à l'origine de l'intensification de l'ARA des plantules.
- o L'augmentation progressive du pouvoir nitrogénasique des nodosités. Ces derniers très réduits durant les 12 premiers jours de végétation augmentent de manière régulière pour culminer à environ 80nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante au 38<sup>ème</sup> jour de végétation.

Cette intensification du potentiel nitrogénasique des plantules serait en relation avec:

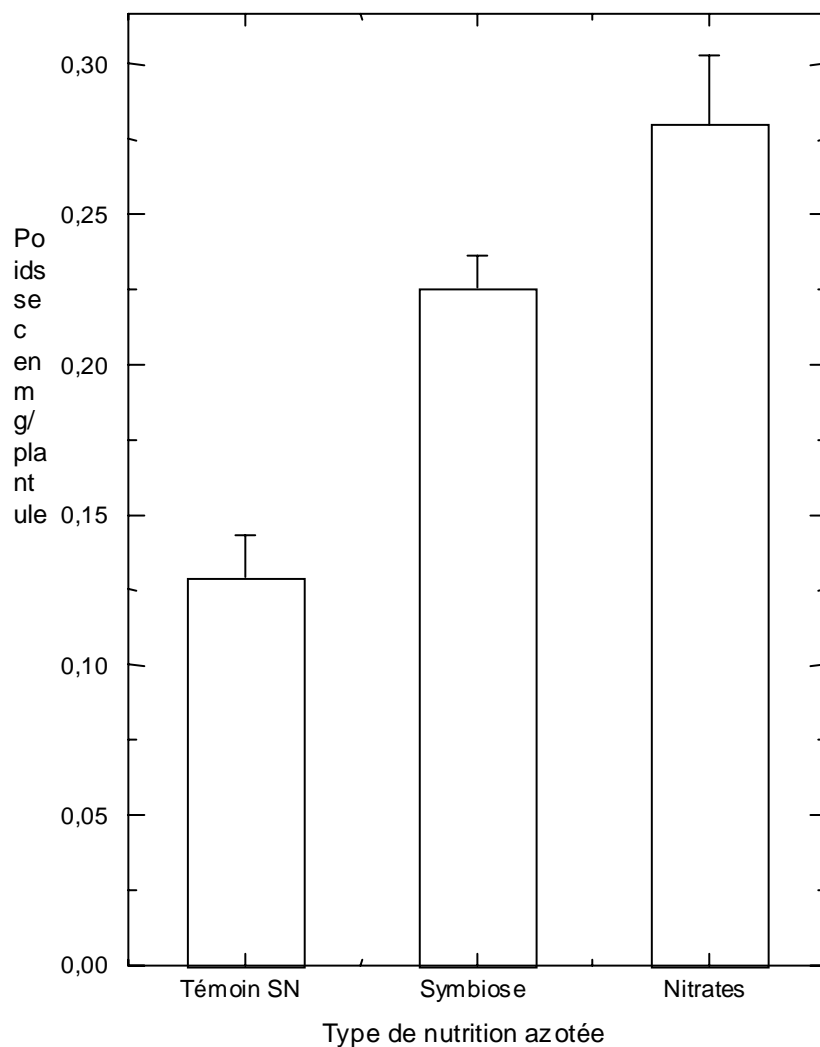
- o la maturation des nodules qui après leur initiation, subissent une croissance se traduisant par l'augmentation du fonctionnement de la nitrogénase en fonction de la teneur en cet enzyme et en légghémoglobine (River et Simms, 2000).
- o le développement de la plante hôte qui s'accompagne par une intensification de son activité photosynthétique et donc de la quantité de photosynthétats mis à la disposition des bactéroïdes. Ces derniers, disposant d'une plus grande quantité de substrats énergétiques, augmentent leur niveau d'activité métabolique dont celui du complexe nitrogénasique (Streeter 1988).

### **1-5 Effet de la symbiose sur la croissance de la plante**

Après 36 jours de végétation en milieu déficient en azote, le bersim présente, suivant qu'il est nodulé ou non, des différences sur le plan biométrique.

Les plantules du bersim, assurant leur nutrition azotée grâce à la symbiose, atteignent après 36 jours de végétation un poids sec, partie aérienne et partie racinaire confondues, de 16,55 mg/plantule (Fig. 12). Lorsque celles-ci sont cultivées en milieu carencé en azote leur poids sec est nettement inférieur avec seulement 12,91mg/plantule.

Cette supériorité de la symbiose par rapport au témoin sans azote indique que celle-ci contribue de manière substantielle à la



**Figure 12** : Comparaison du poids sec des plantules de Bersim (variété Tigri) dans le cas du témoin carencé en azote, du témoin azoté (15mM de  $\text{KNO}_3$ ) et de la symbiose avec la souche LBS-107. (Chaque barre représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune, surmontée de son erreur standard).

croissance de la plante. Elle assure, au moins partiellement les besoins en azote de celle-ci.

Cependant, comparativement au témoin azoté (15mM KNO<sub>3</sub>) qui permet à des plantules de bersim, non inoculées, d'atteindre un poids sec de 28mg/plantule, les plantules assurant leur nutrition azotée par la symbiose présentent un poids sec inférieur d'environ 20%. Infériorité qui laisse indiquer que la nutrition nitratée (15mM de KNO<sub>3</sub>) assure une meilleure alimentation en azote des plantes que la symbiose par la souche LBS-107.

La supériorité, *in vitro*, de la nutrition azoté nitrate sur la symbiose est en accord avec les données de la littérature (Bloom 1995, Vance et Graham 1995).

Elle trouverait son explication dans le fait que :

- o Le coût énergétique de la fixation sybiotique de l'azote (16ATP) est plus élevé que celui nutrition nitatée (12ATP=nitrates (12ATP) (Stam et al, 1987).
- o Le niveau de fixation d'azote conféré par la souche LBS-107 au Bersim peut ne pas couvrir entièrement ses besoins en azote.

Conclusion :

L'établissement de la symbiose entre le bersim et *R leguminosarum* bv *trifolii* apparaît donc comme un processus relativement rapide. Les plantules de bersim sont déjà nodulées 10 jours après leur inoculation par la souche LBS-107. IL en est de même pour la fixation d'azote ( l'activité réductrice d'acétylène) ou ARA) qui a été mise en évidence 14 jours seulement après l'inoculation des plantules de bersim.

La symbiose avec le souche LBS-107 confère au bersim la propriété d'assurer la couverture des ses besoins en azote et de passer , dans une certaines mesure de la présence dans le sol d'une source d'azote minérale (nitrate et/ou ammoniacque).En effet, les plantules de bersim (variété tigri)ont monté , après seulement 43 jours de végétation , in poids sec supérieur de 43% comparativement à un témoin carencé en azote.

Cependant, comparativement au témoin azoté (15mM KNO<sub>3</sub>) qui permet à des plantules de bersim, non inoculées, d'atteindre un poids sec de 28mg/plantule, les plantules assurant leur nutrition azotée par la symbiose présentent un poids sec inférieur d'environ 20%.

Malgré sa légère infériorité vis-à-vis d'une nutrition azotée optimale, la symbiose reste un phénomène biologique dont l'utilisation est intéressante . La couverture, même partielle, des besoins de la plante en azote permet de se passer de l'utilisation massive des engrais azotés.

C'est cette propriété qui fait que la symbiose à *Rhizobium* constitue un élément incontournable des politiques nationales et internationales d'agriculture durable, d'agriculture biologique ou encore de la réduction des émissions de gaz à effet de serre (Vitousek et al.,1997).

## 2 - Constitution du soucier

### 2-1 Extraction des souches de *Rhizobium* à partir de nodosités de légumineuses prélevées au champ

Dans la première partie de notre étude, nous nous sommes efforcés de constituer une collection de souches de *Rhizobium* compétentes envers le Bersim, à savoir des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* dont le groupe d'inoculation n'inclut que les représentants du genre *Trifolium*. (Jordan, 1982; Vincent, 1982; Elkan, 1992; Lindström, 1996).

A cet effet, nous avons prélevé de différentes régions d'Algérie des représentants spontanés ou cultivés de ce genre et nous avons procédé à l'extraction, l'isolement et la purification des souches de *Rhizobium* qui leurs sont associées.

Les plantes échantillonnées, leur origine et leur statut symbiotique au moment du prélèvement figurent au (Tab : II).

L'analyse de ce tableau indique que la totalité des légumineuses du genre *Trifolium* que nous avons examiné, au nombre de 37 représentants, répartis sur 21 espèces soit 56% des espèces recensées en Algérie par Quezel et Santa (1962) présentent sur leur système racinaire les nodosités caractéristiques de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses. Ces nodosités se sont révélées tout efficaces, c'est à dire capable de réduire l'azote moléculaire en ammoniac.

Ces résultats laissent indiquer que la symbiose à *Rhizobium* est largement répandue chez les *Trifolium* d'Algérie, faisant de ce groupe un potentiel biologique intéressant en tant que plantes spontanées pour la colonisation des sols pauvres en azote et leur enrichissement.

La nature du sol ainsi que les conditions climatiques ne semblent pas constituer des facteurs limitants de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses dès le moment où ils n'affectent pas la croissance et le développement de ces dernières (Lowendorf, 1980; Allen et Allen, 1980).

**Tableau II** . Origine et caractéristiques symbiotiques des souches de *Rhizobium* extraites de plants de *Trifolium spp.* spontanées (S) ou cultivées © collectés sur le terrain.

Souche	Espèce	Type	Localité	Zone	Nodulation	Fixation
E1	<i>T.repens</i>	S	Bab Ezzouar	Alger	+++	E
E2	<i>T.subterraneum</i>	S	Bab Ezzouar		++	E
E3	<i>T.campestre</i>	S	Douera		++	E
E4	<i>T.repens</i>	S	Douera		++	E
E5	<i>T.spumosum</i>	S	Mahelma		+	E
E14	<i>T.stelletum</i>	S	Ben Aknoun		+++	E
E22	<i>T.cherleri</i>	S	Baba Hassen		+++	E
E33	<i>T.lappaceum</i>	S	Baba Hassen		++	E
E36	<i>T.subterraneum</i>	S	Meftah		+++	E
E17	<i>T.alexandrinum</i>	C	Douera		+++	E
E6	<i>T.repens</i>	S	Hadjout	Tipaza	++	E
E10	<i>T.fragiferum</i>	S	Hadjout		++	E
E15	<i>T.cherleri</i>	S	Chenoua		+++	E
E18	<i>T.glomeratum</i>	S	Koléa		+++	E
E23	<i>T.stelletum</i>	S	Koléa		+++	E
E7	<i>T.tomentosum</i>	S	Isser	Tizi-Ouzou	+++	E
E9	<i>T.resupinatum</i>	S	Naciria		+	E
E13	<i>T.bocconeii</i>	S	Isser		+++	E
E16	<i>T.scabrum</i>	S	Mechetras		++	E
E20	<i>T.fragiferum</i>	S	Isser		+++	E
E25	<i>T.pallidum</i>	S	Isser		+++	E
E28	<i>T.stelletum</i>	S	Taguemount		+++	E
E31	<i>T.alexandrinum</i>	C	Ouadhias		+++	E
E32	<i>T.juliani</i>	S	Béni douala		++	E
E37	<i>T.glomeratum</i>	S	Isser		+++	E
E34	<i>T.maritimum</i>	S	Isser	++	E	
E8	<i>T.campestre</i>	S	Si-Mustapha	Boumerdes	+++	E
E24	<i>T.michelianium</i>	S	Béni-Amrane		+++	E
E26	<i>T.subterraneum</i>	S	Béni-Amrane		+++	E
E30	<i>T.pallidum</i>	S	Béni-Amrane		+++	E
E11	<i>T.subterraneum</i>	S	Bougara	Blida	++	E
E12	<i>T.alexandrinum</i>	C	Arbatache		+++	E
E19	<i>T.squarosum</i>	S	Arbatache		+++	E
E35	<i>T.pratens</i>	S	Soumaa		+	E
E21	<i>T.alexandrinum</i>	C	Abadla	Béchar Setif S-Belabbes	+	E
E27	<i>T.alexandrinum</i>	C	Djemila		+++	E
E29	<i>T.arvensis</i>	S	Tessala		+++	E

S : pontanées, C : cultivées.

### **2-1-1 Authentification et sélection des souches de *Rhizobium* compétentes envers le bersim**

Une souche bactérienne, même extraite des nodosités d'une légumineuse, ne peut être considérée comme une souche de *Rhizobium*, que si elle est capable d'induire la nodulation, en conditions bactériologiques contrôlées, chez au moins une des légumineuses de son groupe d'inoculation (Vincent, 1981; Elkan, 1992; Pieterneel et Vanderleyden, 1995). En effet, on ne peut pas exclure la possibilité que cet isolat appartienne à un autre type bactérien qui aurait échappé à la stérilisation de la surface du nodule ou qui proviendrait d'une contamination accidentelle lors des manipulations. C'est pour cette raison qu'il est indispensable d'authentifier les souches extraites des nodosités pour s'assurer de leur statut.

Pour authentifier nos 37 isolats bactériens et évaluer, par la même occasion, leurs performances symbiotiques, nous avons inoculé, *in vitro*, et en conditions bactériologiques contrôlées, ces isolats à des plantules axéniques de deux variétés de bersim: var. Nungarin et var. Tigri.

Les résultats obtenus (Tab.IV ) montrent que la majorité des isolats testés (69 cas sur 74 soit 93,24%) sont capables d'infecter et de noduler au moins une des deux variétés de bersim.

Ces isolats sont de ce fait authentifiés comme des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* puisque le bersim est nodulé exclusivement par les souches de l'espèce *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Certaines légumineuses sont très promiscuités (Debelle et al., 2001), elles ont un pouvoir d'association efficient avec un large spectre de *Rhizobium* comme Vigna, le soja. D'autres espèces sont hautement spécifiques vis à vis de leur groupes de *Rhizobium*, telle que le Lupin, le Trèfle (Burton, 1979. En effet, malgré une très grande proximité avec les souches de *Rhizobium leguminosarum* du biovar *viciae*, la littérature ne rapporte pas à notre connaissance de transgressions de groupe d'inoculation. C'est à dire de souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* capables d'induire la nodulation chez les légumineuses du groupe d'inoculation de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (*Vicia spp.*, *Pisum spp.*, *Lens spp.* et *Lathyrus spp.*).

Tableau III. Potentiel infectif des souches de *R leguminosarum* bv trifolii sur les deux variétés de Bersim testées. Les valeurs portées représentent la moyenne arithmétique de 7 répétition de 3 plantes chacune.

Souche	Espèce	Taux de nodulation vis-à-vis de la variété	
		Nungarin	Tigri
E1	<i>T.repens</i>	2,67	3,33
E2	<i>T.subterraneum</i>	2	3
E 3	<i>T.campestre</i>	1,67	2,67
E4	<i>T.repens</i>	3,67	4,67
E5	<i>T.spumosum</i>	7,67	5,67
E6	<i>T.repens</i>	3	6,67
E7	<i>T.tomentosum</i>	1	2,33
E8	<i>T.campestre</i>	0	0
E9	<i>T.resupinatum</i>	1	2
E10	<i>T.fragiferum</i>	0,67	1,33
E11	<i>T.subterraneum</i>	2,33	3,67
E12	<i>T.alexandrinum</i>	0	4,33
E13	<i>T.bocconeii</i>	0,33	0
E14	<i>T.stelletum</i>	5	3
E15	<i>T.cherleri</i>	0	0
E16	<i>T.scabrum</i>	0	0
E17	<i>T.alexandrinum</i>	2	3,33
E18	<i>T.glomeratum</i>	4	9
E19	<i>T.squarosum</i>	2,33	3,67
E20	<i>T.fragiferum</i>	0,67	2,33
E21	<i>T.alexandrinum</i>	1,67	5,67
E22	<i>T.cherleri</i>	1	1,67
E23	<i>T.stelletum</i>	1,33	2,67
E24	<i>T.michelianium</i>	0,33	1
E25	<i>T.pallidum</i>	1,33	3,33
E26	<i>T.subterraneum</i>	0	2,33
E27	<i>T.alexandrinum</i>	3	4,67
E28	<i>T.stelletum</i>	0,67	2,33
E29	<i>T.arvensis</i>	0	0
E30	<i>T.pallidum</i>	0,67	1,67
E31	<i>T.alexandrinum</i>	3,67	4,33
E32	<i>T.juliani</i>	0,33	1
E33	<i>T.lappaceum</i>	0	0
E34	<i>T.maritimum</i>	0,67	1,33
E35	<i>T.pratens</i>	1,67	2,33
E36	<i>T.subterraneum</i>	0	3,67
E37	<i>T.glomeratum</i>	0,67	0
Moyenne par variété		1,54	2,67
Moyenne		2,10	

Concernant les 5 isolats qui se sont révélés incapables de noduler le bersim (isolats E7, E15, E16, E29 et E33), il pourrait s'agir :

- de souches contaminantes (non-Rhizobiennes) dont l'aspect sur milieu d'isolement est similaire à celui des souches de *Rhizobium* (non-absorption du rouge Congo et aspect mucoïde). Comme c'est souvent le cas par exemple des souches de *Pseudomonas* bien représentées dans la rhizosphère des légumineuses (Beauchamp, 1993).

- de souches ayant perdu leurs capacités symbiotiques. En effet, les gènes intervenant dans l'établissement de la symbiose chez les légumineuses tempérées sont portés par des plasmides (Zeze et al., 2001). Cette localisation prédispose les souches de *Rhizobium* à une perte fréquente de leur pouvoir infectif à la suite de délétions ou encore transfert de plasmide entre souches (Fenton, 1994).

- De souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* non compétentes envers le bersim. En effet, même dans le même groupe d'inoculation croisée on observe des variations interspécifiques. A l'opposé, une souche de *Rhizobium* peut n'être infective que vis-à-vis de certaines des espèces de plantes de son groupe d'inoculation (Sprent, 2001). La littérature rapporte même des cas de variations intraspécifiques, c'est à dire de souches de *Rhizobium* qui ne sont infectives, chez une même espèce de légumineuse, que vis-à-vis de certaines variétés (Sun et Sand, 1992).

## **2-1-2 Performances symbiotiques des souches de *Rhizobium* vis à vis du bersim**

### **A- Sur le plan du pouvoir nodulant**

Dans leur grande majorité, les souches retenues se sont montrées capables d'induire la nodulation chez les deux variétés de bersim. Les taux de nodulation enregistrés varient entre 1 et 9 nodules/plante, avec une moyenne de 2 nodules/plante toutes souches et variétés confondues.

Toutefois, certaines souches se sont révélées incapables de noduler simultanément les deux variétés de bersim. C'est le cas des souches E13 et E37 infectives vis à vis de Nungarin mais pas vis à vis de Tigri. C'est également le cas des souches E12, E26 et E36 qui sont capables de noduler la variété Tigri mais pas la variété Nungarin. Le

cas de ces souches qui ne sont capables de noduler que les plantules de l'une des variétés testées laisse indiquer une différence d'affinité de ces dernières vis à vis de ces souches. Dans leur travaux sur le soja, Kvien et al., (1981) ont trouvé que pour la même souche, le taux de nodulation peut varier d'une variété à une autre.

Cette différence de comportement des deux variétés vis à vis du souchier est également traduite par le taux de nodulation moyen, toutes souches confondues, qui est nettement supérieur dans le cas de la variété Tigri avec 2,67 nodules/plante que dans celui de la variété Nungarin avec seulement 1,54 nodules/plante. Supériorité qui laisse indiquer que la variété Tigri est plus apte à être infectée et nodulée par les souches de *R leguminosarum* bv trifolii associées aux trèfles d'Algérie.

C'est cette différence d'affinité de la plante hôte vis à vis du souchier qui explique que les souches les plus infectives vis à vis d'une variété ne le sont pas forcément pour la deuxième (Weaver et al., 1981). C'est ainsi par exemple que la souche la plus infective vis à vis de la variété Tigri est la souche E18 alors que dans le cas de Nungarin il s'agit de la souche E5. Dans le cas de la variété Tigri, les souches E6 E12 et E21 se sont révélées les plus infectives alors que pour la variété Nungarin il s'agit des souches E31, E4, E5, E6, E14 et E17).

Parmi les souches, les plus infectives vis à vis du bersim nous remarquons une proportion élevée qui provient de plants, de l'espèce *Trifolium alexandrinum* L, prélevés au champ (souches E17, E21, E27 et E31). Ce résultat laisse suggérer qu'une plante donnée sélectionne à partir du sol qui la supporte les souches de *Rhizobium* avec lesquelles elle a le plus d'affinité (Date, 1970). Une affinité conditionnée par des signaux moléculaire impliqués dans la reconnaissance étroite et la compatibilité entre les deux partenaires symbiotiques (Debelle et al., 2001).

C'est cette sélection qui fait que les souches qui proviennent du bersim, nodulent, *in vitro*, fortement les deux variétés de *T. alexandrinum* testées comme par exemple les souches E31. Cette règle n'est cependant pas générale comme le suggère la souche E18 qui provient d'un plant de *T. glomeratum* et qui s'est révélée présenter le plus fort pouvoir infectif vis à vis de la variété Tigri avec 9 nodules/.plante ou encore la souche E5 issue de *T. spumosum* et qui nodule le mieux Nungarin avec 7,67 nodules/plan.

Tableau IV . Activité nitrogénasique, in vitro, des nodosités des couples symbiotiques avec la souche de *R.leguminosarum* Bv trifolii. Le pouvoir fixateur est exprimé en nanomole de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante ou nanomole de C<sub>2</sub>C<sub>4</sub>/h/nodule.

Souche	Nungarin			Tigri		
	Nodulation	Activité nitrogénasique		Nodulation	Activité nitrogénasique	
		Plante.	Nodule		Plante.	Nodule
E1	2,67	241,2	90,45	3,33	333,67	100,1
E2	2	312,4	156,20	3	235,2	78,4
E3	1,67	100,2	60,12	2,67	239,2	89,7
E4	3,67	111,2	30,33	4,67	472,27	101,2
E5	7,67	587,8	76,76	5,67	370,6	65,4
E6	3	274,4	91,49	6,67	361,33	54,2
E7	1	59,8	59,80	2,33	283,03	121,3
E8	0	--	--	0	--	--
E9	1	28,5	28,5	2	509,4	254,7
E10	0,67	34,2	51,3	1,33	61,6	46,2
E11	2,33	195,2	83,66	3,67	457,6	124,8
E12	0	--	--	4,33	191,97	44,3
E13	0,33	24,2	72,6	0	--	--
E14	5	287,8	57,56	3	261,6	87,2
E15	00	--	--	0	--	--
E16	2	--	--	0	--	--
E17	4	142,2	71,10	3,33	291	87,3
E18	2,33	521,4	130,35	9	1096,2	121,3
E19	0,67	168,2	72,09+	3,67	173,43	47,3
E20	1,67	48,7	73,05	2,33	236,6	101,4
E21	1	152,1	91,26	5,67	707,2	124,8
E22	1,33	87,3	87,30	1,67	47,83	28,7
E23	0,33	171,4	128,55	2,67	112,8	42,3
E24	0	15,2	45,60	1	61,8	61,8
E25	1,33	114,1	85,55	3,33	404	121,2
E26	0	--	--	2,33	157,27	67,4
E27	3	241,3	80,43	4,67	519	111,4
E28	0,67	17,2	25,80	2,33	87	47,8
E29	0	--	--	0	111	--
E30	0,67	35,1	52,65	1,67	--	101,4
E31	0	417,8	113,95	4,67	52,33	31,4
E32	3,67	18,5	55,50	1	52,33	86,7
E33	0,67	--	--	0	51,4	51,4
E34	0	31,4	47,10	1,33	--	--
E35	0,67	124,3	74,58	2,33	51,6	38,7
E36	1,670	--	--	3,67	192,94	82,7
E37	0,67	32,4	48,60	0	349,8	95,4

Nous remarquons que dans les lots des souches les plus infectives vis à vis des deux variétés de Bersim, que les souches issues de *T. repens* sont fortement représentées ( souches E1, E4 et E6)

Le fait que trois souches isolées de nodosités de *T. repens* sont fortement infectives vis à vis du bersim peut ne pas être fortuit. En effet, ceci laisse suggérer que le bersim est proche de *T. repens* sur le plan de son affinité vis à vis des souches de *Rhizobium*. Cette convergence du bersim et de *T. repens* vis à vis des souches de *Rhizobium* pourrait résulter des nombreux remaniements subis par le bersim dans le cadre de l'amélioration et de la sélection variétale.

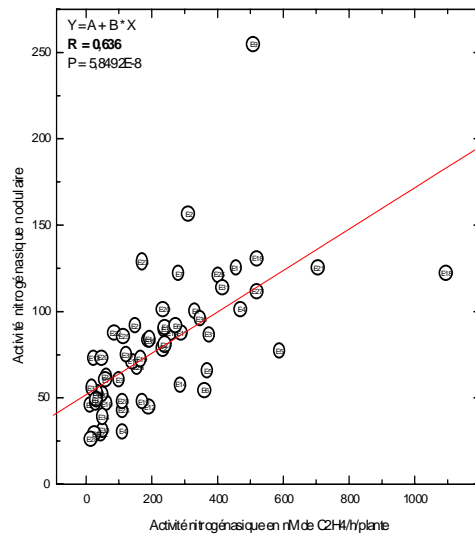
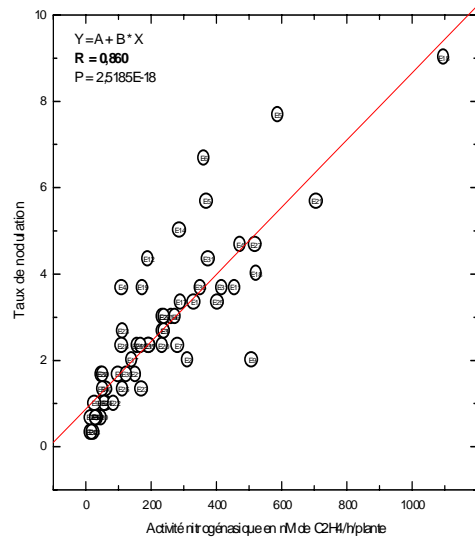
#### **B- Sur le plan du pouvoir fixateur d'azote**

Lorsqu'une souche de *Rhizobium* induit la formation de nodosités chez une légumineuse, le couple symbiotique résultant n'est pas forcément efficient, c'est à dire capable de réduire l'azote moléculaire en azote ammoniacal. En effet, le génome des deux symbiotes peut stimuler, inhiber ou empêcher l'expression physiologique de la symbiose: *Rhizobium*-légumineuse, l'activité nitrogénasique au sein du nodule (Phillips, 1980; Lie, 1982).

Tous les couples symbiotiques obtenus pour les deux variétés de bersim ont montré une activité fixatrice d'azote significative (Tab. IV) avec un niveau d'activité nitrogénasique (ARA) qui varie entre 17,2 et 1096nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante suivant le couple symbiotique considéré et une moyenne toutes souches et variétés confondues de 220 nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante.

le niveau de fixation par plante est de 158,4 pour Nungarin et 292 nM de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/h/plante pour Tigri soit près du double.

Comme pour la nodulation les souches provenant de plants de bersim prélevés sur le terrain montrent dans l'ensemble de plus grandes efficience que les autres souches. En effet, le niveau moyen d'activité nitrogénasique enregistrée en leur présence(327nM de c<sub>2</sub>h<sub>4</sub>/h/plante) est nettement bsupérieure à la moyenne du souchier ou encore à celle des autres souches (225 et 206 nM de c<sub>2</sub>h<sub>4</sub>/h/plante).



**Figure 13** : Régression linéaire du niveau d'activité nitrogénasique (ARA) des plantules de Bersim sur le taux de nodulation (**A**) et l'activité nitrogénasique nodulaire (**B**). R représente le coefficient de corrélation entre les deux paramètres pris en considération.

Cette supériorité sur le plan de l'efficacité symbiotique, *in vitro*, des souches extraites de plants de Bersim est à mettre au compte des taux de nodulation plus élevés enregistrés chez le bersim en présence de ces souches (Fig.13).

Cette relation entre le niveau d'infectivité d'une souche et son niveau d'efficacité symbiotique est bien illustrée dans notre cas par la corrélation étroite ( $R=0,86$ ) qui existe entre le taux de nodulation et le niveau d'activité nitrogénasique .

Cette relation indique que plus une souche est infective plus elle est potentiellement efficace en symbiose avec sa plante hôte. Cette règle n'est cependant pas générale, car il est important de distinguer la différence entre le pouvoir d'une souche de noduler une plante et l'efficacité des nodules qui en résultent (Sprent, 2001).

C'est ce qui explique, dans le cas de la variété Nungarin par exemple, que le couple symbiotique impliquant la souche E2 se retrouve avec seulement 2 nodules beaucoup plus efficaces (312nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante) que le couple symbiotique E14 (287 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante) qui pourtant présente un taux de nodulation nettement supérieur (5 nodules/plante).

Le niveau d'activité nitrogénasique exprimé par nodule varie entre 28 et 254nm de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule suivant la souche et la variété considérée (Tab.IV). L'activité nitrogénasique nodulaire la plus faible a été enregistrée pour la souche E28 en présence de la variété Nungarin et la plus forte pour la souche E9 en présence de la variété Tigri. L'activité nitrogénasique nodulaire moyenne, toutes souches confondues, est pour sa part de 78nm C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule pour les deux variétés testées.

Le niveau de fixation par plante est également corrélé ( $R=0,63$ ) avec le niveau d'efficacité du nodule (Fig. 13 ). Cette corrélation est cependant plus faible que celle obtenue avec le taux de nodulation ( $R=0,88$ ) ce qui laisse indiquer que ce dernier est statistiquement plus probant pour la prédiction de l'activité nitrogénasique d'un couple symbiotique. Ce qui est somme toute logique puisque le niveau de nodulation -l'infectivité- d'une souche est le paramètre qui traduit le mieux son degré d'affinité à la plante hôte.

Les variations du niveau d'activité nitrogénasique des nodules de *T. alexandrinum* L en présence des différentes souches de *Rhizobium* ne peuvent résulter que de facteurs intrinsèques à ces dernières ou induits par celles-ci au niveau de l'interaction, comme par exemple :

**Tableau V** . Evaluation du pouvoir infectif vis-à-vis du Bersim, en pot, du pool de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii de 30 sols testés. Les taux de nodulation exprimés en nombre de nodules par plante, représentent la moyenne arithmétique de 5 répétitions de 7 plantes chacune (35 plantes).

Souche	localité	Zone	Taux de nodulation	
			Tigri	Nungari n
P1	Ténés	<b>Tipaza</b>	2,2	0,2
P25	Chervhell		3,4	2,2
P2	Mazagran	<b>Mostaganem</b>	4,6	1,2
P3	Gdyel	<b>Oran</b>	3,8	1,6
P4	Gharaouet		<b>Tlemcen</b>	5,4
P5	Mnedroma	3,6		1
P6	Amizour	<b>Bejaia</b>	8,4	1,8
P14	Bir Ghalou		4,2	1,8
P7	Azazga	<b>Tizi-Ouzou</b>	8,2	2,6
P8	Ben Zireg	<b>Setif</b>	6,2	3,8
P9	Chelghoum		7,4	3
P10	Djemila	<b>Setif</b>	9,4	3,4
P11	Dean	<b>Annaba</b>	4,8	3
P12	Bouira	<b>Bouira</b>	6,4	2
P13	Ain Bessem		6,8	2,2
P15	Bou Saada	<b>M'Sila</b>	8,4	3,8
P18	M'Sila		6,8	2,6
P16	Biskra	<b>Biskra</b>	3,8	1,6
P17	Chegga		3,8	2
P19	Djamaa	<b>Ouargla</b>	3,8	2,4
P20	Temacine		5,6	3
P29	Ouargla		6,6	3
P21	El Oued	<b>El Oued</b>	4,2	2
P22	Beni Abbes	<b>Beni Abbes</b>	6,6	3
P23	Djelfa	<b>Djelfa</b>	6,6	3,4
P24	Jijel	<b>Jijel</b>	4,2	2
P26	Laghouat	<b>Laghouat</b>	3,2	1
P27	Berrian	<b>Ghardaia</b>	11	4,6
P28	Ghardaia		12,8	5,2
P30	El Goléa		4,8	2,6
<b>Moyenne par variété</b>			5,9	2,46
moyenne			415	

- le nombre de nodules présents sur le système racinaire de la plante hôte et la biomasse nodulaire qui est caractèrè fortèment corrèlé à l'amélioration de la fixation de N<sub>2</sub> (Gall et al., 1987)
- L'activité de la nitrogénase dont l'intensité peut varier d'une souche à une autre (Hartwig 1987, Hadker et al., 2001).
- L'efficacité d'utilisation par les bactéroïdes du potentiel énergétique fourni par la plante. Utilisation qui peut différer elle aussi d'une souche à l'autre (Kohl et Reynolds, 1989 Hunt et Layzell 1993).

## **2-2 Potentiel symbiotique des sols testés**

En parallèle aux extractions à partir de légumineuses prélevées sur le terrain, nous avons enrichi notre souchier par le biais d'une autre méthode de collecte de souches à savoir le piégeage des *Rhizobium ex situ*. Opération qui consiste à induire des symbioses au laboratoire en procédant à des cultures de Bersim en pots renfermant des échantillons de sol provenant de 30 localités différentes.

Nous avons réalisé ce piégeage sur les 2 variétés de Bersim afin de déterminer si elles tirent profit de la même manière du potentiel rhizobien des sols d'Algérie.

### **2-2-1 Sur le plan du pouvoir nodulant (infectivité)**

Les 30 sols testés se sont révélés capables de noduler le bersim. En effet, toutes les combinaisons sol-plante explorées ont donné lieu à des couples symbiotiques chez le bersim (Tab.V).

Ce résultat indique que les sols utilisés renferment en quantité suffisante des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Ils constituent un environnement physico-chimique favorable à l'établissement de symbioses à *Rhizobium* chez le bersim (May, 1983). Pour une même variété le taux de nodulation varie considérablement selon le sol considéré. Cette variation est de 2,2 à 12,8 nodules/plantes dans le cas de la variété Tigri et de 0,2 à 5,2 nodules/plante la variété Nungarin.

Ces variations au sein de la même variété du taux de nodulation des plantules de bersim, peut résulter:

- de différences entre les potentiels Rhizobiens de ces sols, sur le plan de leur richesse numérique et/ou celui de leur diversité en *R leguminosarum* bv trifolii (Jebara et al., 2001).
- La nature des exsudats racinaires des plantes de chaque variété. (Hanter et Mengel, 1988) notamment les flavonoides qui influent fortement le taux de nodulation (Bergum et al., 2001).
- L'influence de l'environnement physico-chimique, à savoir le taux d'azote minéral des différents sols, sur des mécanismes menant à l'établissement de la symbiose entre le bersim et les souches de *R leguminosarum* bv trifolii qui se traduit par le taux de nodule formé par les plantes (Dovel et al., 1993; Knezek, 1997).

En plus de ces variations qui dépendent du substrat édaphique, nos résultats indiquent qu'il existe des variations qui semblent dues à la plante elle-même. En effet, les deux variétés de bersim répondent de manières différentes au potentiel Rhizobien des sols testés. Le taux de nodulation tous sols confondus est de 5,9 nodules/plante contre seulement 2,4 pour la variété Nungarin.

Les deux variétés de bersim ayant été testées sur un grand nombre de sols présentent des variations dans leur taux de nodulation moyen tous sols confondus ne peut être attribuée qu'à la plante elle-même, c'est à dire au génotype des variétés de bersim. La variété Tigri apparaissant ainsi beaucoup plus susceptible aux *R leguminosarum* bv trifolii des sols testés que la variété Nungarin vraisemblablement en raison d'une grande affinité vis à vis du pool des *R leguminosarum* bv trifolii des sols d'Algérie (Bernel et Graham, 2001).

Cette différence de susceptibilité d'une légumineuse à l'infection par les *Rhizobium* dépend en dehors de la présence en quantité suffisante de *Rhizobium* compétents d'autres facteurs propres au macrosymbiote et parmi lesquels nous citerons:

- o La quantité et la qualité de l'exsudation racinaire qui concoure à amplifier la population Rhizobienne rhizosphérique (Mathesius et al., 2000), et son rôle dans l'établissement de la symbiose semble pour sa part bien établi
- o la qualité et la quantité de la signalisation moléculaire de la plante pour attirer spécifiquement des *Rhizobium* compétents vers les sites d'infection

**Tableau VI** .Activité nitrogénasique, in vitro, des nodosités des couples symbiotiques avec la souche de *R.leguminosarum* Bv trifolii dans 30 sols testés. Le pouvoir fixateur est exprimé en nanomole de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante ou nanomole de C<sub>2</sub>C<sub>4</sub>/h/nodule.

Souche	Activité nitrogénasique		Activité nitrogénasique	
	Plante.	Nodule	Plante.	Nodule
P1	63,23	28,74	23,76	118,76
P2	224,01	28,74	86	71,76
P3	381,21	48,7	156,71	97,94
P4	357,5	100,32	186,6	103,67
P5	184,86	66,2	82,56	82,56
P6	857,63	51,35	334,22	185,68
P7	185,48	102,1	112,82	43,39
P8	647,45	22,62	294,15	77,41
P9	1003,23	104,43	496,62	165,54
P10	944,32	135,57	338,04	99,42
P11	380,96	79,37	163,27	54,42
P12	565,83	88,34	249,16	124,558
P13	546,32	78,33	237,47	107,94
P14	328,98	67,35	134,32	74,62
P15	565,71	67,35	239,11	62,92
P16	176,84	46,54	75,79	47,37
P17	132,63	34,9	50,17	25,09
P18	170,05	25,01	72,88	28,03
P19	213,02	65,06	74,63	31,09
P20	537,55	95,99	213,71	71,24
P21	110,65	26,34	44,09	22,04
P22	521	78,94	209,95	69,98
P23	305,27	46,25	114,16	33,58
P24	421,22	100,29	164,86	82,43
P25	260,81	76,71	145,11	65,96
P26	138,8	43,38	39,49	39,49
P27	634,73	57,7	305,36	66,39
P28	1264,53	98,79	608,61	117,04
P29	601,64	91,16	261,18	87,06
P30	400,23	83,38	184,86	71,1
Moyenne	158,46	73,86	292,36	83,90

- o L'extension du système racinaire et en particulier sa richesse en poils absorbants cible préférentielle de l'infection par le *Rhizobium*

### **2-2-2 Sur le plan du pouvoir fixateur d'azote (efficience)**

Les 60 couples symbiotiques issus des combinaisons sol-plante que nous avons explorées se sont révélés tous capables de fixer l'azote moléculaire. Ces couples sont par conséquent capables d'assurer au moins partiellement, la couverture de leurs besoin en azote.

Les niveaux de fixation varient entre 23,76 et 1003,23 nM d'acétylène/h/plante avec une moyenne tous sols et les deux variétés confondues de 313 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante.

Comme pour la nodulation la variété Tigri s'est révélée significativement ( $p=0,05$ ) plus efficace avec un niveau d'activité nitrogénasique moyen, tous sols confondus de 437,37nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante contre seulement 190 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante pour la variété Nungarin. Supériorité prévisible au regard des taux de nodulation qui rappellent le sont révélés nettement supérieurs chez Tigri.

Le niveau d'efficience exprimé par nodule varie pour sa part entre 23 et 185nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule pour la variété Nungarin avec une moyenne de 74,45nMde C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule. Par contre Tigri présente une efficience de 26 à 135 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule et une moyenne de 70 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule. Statistiquement aucune différence significative n'est présente entre les niveaux de fixation moyens 70,52 et 74,45nMde C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule pour Tigri et Nungarin respectivement à  $p_{0,05}$ .

ce qui indique que les variations du niveau d'efficience des deux variétés résulte de leur différence de susceptibilité à la nodulation plutôt qu'au fonctionnement des nodules.

Pour la suite de cette étude et à fin de réduire le volume des manipulations. Nous avons convenu de ne retenir que les souches jugées très performantes sur le plan symbiotique avec la variété Tigri Pour cela seules les souches qui confèrent aux plantules de Tigri une ARA de 110nMde C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante sont choisies.

Les 37 souches se repartissent comme suit :

- o 10 souches issues du premier souchier provenant de l'extraction à partir de légumineuses prélevées sur terrain.
  - o 27 souches issues du deuxième souchier provenant de nodosités de plantes obtenues ex-situ (piégeage).
- De même nous n'avons retenu comme plante cible que la variété tigris en raison de sa nette supériorité sur le plant des performances symbiotiques.

### **2-3 Authentification des isolats et évaluation de leurs performances symbiotiques vis à vis du Bersim**

Les 37 souches de *R. leguminosarum* retenues ont été réinoculées à des plantules de la variété Tigris pour les authentifier et confirmer, in vitro, leur pouvoir symbiotique.

Les résultats obtenus (Tab. VII ), indiquent que la majorité des isolats testés est capable d'induire, in vitro, la formation des nodules sur la variété Tigris. De ce fait les isolats concernés sont authentifiés comme étant bien des souches de *R. leguminosarum* bv trifolii. Seul un isolat, le P12N (isolé de plantules de la variété Nungarin), s'est révélé incapable de noduler les plantules de la variété Tigris.

Le taux de nodulation des plantules s'échelonne entre 1,33 et 10,8 nodules/plantes, avec une moyenne, toutes souches confondues, de 4,45 nodules/plante.

L'ARA des couples symbiotiques obtenus varie pour sa part entre 104 et 627 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante ou encore de 25 et 138 nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule avec des moyennes de 233,27 nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante et de 55,07 nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/nodule. La comparaison des performances symbiotiques de ces souches en fonction de leur plante cible d'origine (Tigris ou Nungarin) ou de la méthode d'isolement (Extraction ou piégeage) (Tab.VII ).

Tableau VII. Performances symbiotiques des plantules de Bersim var Tigri en presence de 37 souches de *R leguminosarum* bv trifolii (E) et (P). Le taux et l'activité nitrogénasique ( nM de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante ou nodule) représente la moyenne arithmétique de 7 répétitions de 3 plantes chacune( 21 plantes).

Souche	Taux de nodulation	Activité nitrogénasique	
		Par plante	Par nodule
P28T	10,8	627,66	58,12
P09T	6,10	587,77	96,36
P10T	7,8	484,36	62,10
P06T	7,10	466,36	65,77
P08T	6,5	330,22	50,80
P27T	9,8	282,90	28,87
P29T	5,2	196,29	37,75
P12T	4,33	251,08	57,94
P15T	7,33	270,52	36,89
P13	5,33	257,25	48,23
P20T	4,33	258,70	59,70
P22T	5,67	293,49	51,79
P24T	3,33	248,08	74,42
P30T	5,33	224,66	42,12
P03T	2,00	196,01	98,01
P11T	3,00	182,83	60,94
P04N	4,67	206,61	44,27
P28N	4,67	259,39	55,58
P09N	4	277,62	69,41
P10N	2	187,44	93,72
P06N	1,33	184,95	138,72
P27N	3,33	133,64	40,09
P08N	4,67	126,34	27,07
P29N	2,33	104,89	44,95
P12N	0	--	--
P15N	3,33	132,06	36,92
P13N	1,67	128,50	77,10
E18T	8,33	322,07	39,85
E21T	6	225,73	37,62
E27T	5	173,29	34,66
E09t	2	129,80	64,90
E04T	5,33	134,09	25,14
E11T	3,67	105,87	28,87
E25T	3	151,33	50,44
E05N	1,67	84,78	50,87
E18N	2,33	107,15	45,92
E31N	1,33	62,44	46,83
<b>Moyenne</b>	<b>4,45</b>	<b>233,27</b>	<b>55,07</b>

L'analyse de ce tableau indique que les souches ex Tigri sont significativement plus infectives et efficaces ( $p=0,05$ ), *in vitro*, vis à vis de la variété Tigri que souches ex Nungarin qu'elles aient été isolées par extraction ou par piégeage. Observation confirmant supériorité Tigri sur Nungarin enregistrée sur sols mais milieu complexe pas décisive.

**Tableau VIII:** Comparaison des performances symbiotiques,, *in vitro*, des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii, classées selon leur variété d'origine, vis à vis de *Trifolium alexandrinum* L variété Tigri.

Nungarin			Tigri		
Nombre de nodule	Activité nitrogénasique/h		Nombre de nodule	Activité nitrogénasique/h	
	Par plante	Par nodule		Par plante	Par nodule
2,87*	158,88 *	53,25*	5,53*	278,7 3*	50.40*

\* Moyennes significativement différentes ( $p=0,05$ ).

Par ailleurs, ces résultats laissent indiquer que d'une manière générale les souches issues du piégeage (souche à préfixe P) montrent des performances symbiotiques vis à vis du bersim supérieures à celles des souches issues des extractions (Tab. VIII ). La technique du piégeage se révèle ainsi nettement plus intéressante que la méthode classique des extractions pour la constitution rapide d'un soucier performant destiné à une plante précise comme c'est souvent le cas lorsqu'on veut produire des inoculums pour l'agriculture.

## Conclusion

La symbiose avec les *Rhizobium* est un phénomène répandu dans les sols d'Algérie chez les légumineuses susceptibles à *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Toutes les légumineuses des différentes espèces du genre *Trifolium* que nous avons rencontré lors de nos campagnes de prélèvement se sont révélées nodulées et efficaces.

De même, les 30 échantillons de sol étudiés au laboratoire pour l'évaluation du potentiel symbiotique des sols d'Algérie, se sont tous révélés capables d'induire la nodulation sur des plantules du Bersim, le seul trèfle cultivé en Algérie.

Les souches extraites à partir des nodosités de différentes espèces du genre *Trifolium* se sont montrées dans leur grande majorité (86%) capables d'infecter, *in vitro*, au moins une des deux variétés de bersim testées et de former avec celle-ci des symbioses fixatrices d'azote.

Le Bersim bien qu'il représente une espèce d'introduction récente en Algérie ne semble pas présenter une exigence particulière vis à vis des souches de

*R leguminosarum* bv *trifolii* puisqu'elle est susceptible à la majorité des souches extraites des espèces de légumineuses du genre *Trifolium*.

Nos résultats indiquent que d'une manière générale, les souches extraites des plants de Bersim nodulent, *in-vitro*, plus fortement les plantules de cette espèce que celles provenant des autres espèces de trèfle. Ce dernier résultat laisse indiquer que le Bersim sélectionne à partir du sol qui le supporte parmi la diversité les souches existantes dans le sol, les *Rhizobium* avec lesquelles il présente le plus d'affinité (Paffeti et al., 1996). Les souches sélectionnées par les autres espèces de trèfle, bien qu'elles soient généralement compatibles pour le bersim ne sont pas très performantes, tant sur le plan du pouvoir infectif que de celui du potentiel nitrogénasique. Résultat qui s'explique par le fait que chacune de ces plantes a sélectionné la souche qui lui convient le mieux mais pas forcément au bersim.

Cette règle n'est cependant pas absolue puisque la souche qui nodule le plus fortement le bersim, la souche E18 provient des nodosités d'un plant de *trifolium glomeratum*.

C'est ce qui expliquerait que le souchier constitué via l'extraction à partir de nodosités de plants de divers trèfles prélevés dans la nature s'est révélée dans l'ensemble moins performant avec le Bersim que le souchier obtenu directement sur ce dernier par le biais de la technique de piégeage.

La stratégie qui consiste à constituer un souchier pour une plante donnée en procédant à l'extraction des *Rhizobium* sur des plants d'espèces du même groupe d'inoculation n'est pas forcément la meilleure. En effet, comme il peut exister des problèmes d'affinité au niveau genre, espèce et même variété ou population, ce souchier peut se révéler faiblement compétent vis à vis d'une plante cible particulière même si celle-ci fait partie du même groupe d'inoculation.

### **3 - Caractéristiques des souches retenues**

Pour cette caractérisation, nous avons procédé soit de manière classique (tests en tubes à essais) pour les tests quantitatifs ou en microgaleries adaptées au laboratoire de biologie du sol.

#### **3-1 Caractéristiques culturelles**

##### **En milieu solide**

Sur milieu YEMA, les souches étudiées forment des colonies visibles après seulement 48 à 72 heures d'incubation à 25°C, ce qui indique que leur croissance est relativement rapide.

Les colonies formées sont circulaires à bord régulier et à élévation convexe. Elles sont toutes de texture homogène et de couleur blanche ou crème. Aucune d'entre-elles n'a montré de pigmentation ou de fluorescence naturelle.

Les colonies formées par nos souches présentent un aspect translucide et brillant. Ces derniers caractères étant en relation avec l'excrétion à l'extérieur des cellules de polysaccharides extracellulaires (exopolysaccharides ou EPS) responsable de l'aspect mucoïde des colonies des souches de *Rhizobium*.

Ces polymères saccharidiques, faiblement fixés à la surface cellulaire et organisés en gangue muqueuse (slime) entourant.

solide montrent deux zones distinctes:

- une zone centrale, généralement de petite taille (1 à 3mm de diamètre) renfermant l'essentiel des cellules bactériennes. C'est une zone réfringente d'aspect mat qui peut adsorber faiblement le rouge congo.
- une zone périphérique, translucide et brillante, dans laquelle s'accumulent les EPS excrétés par les cellules de la zone centrale. Du fait de la viscosité généralement élevée de ce matériel, il est difficile aux cellules cantonnées au centre, de s'étendre vers cette zone. Elle présente généralement une surface beaucoup plus étendue que la zone centrale.

La taille des colonies formées par nos souches sur milieu YEMA est très variable. Elle s'échelonne entre 19mm pour la souche formant les plus grands clones (souche P28N) et 5mm pour les souches formant les plus petits clones: P11T, P03T et P09T). La taille moyenne des colonies est pour l'ensemble du soucier de l'ordre de 9,25mm.

La taille des colonies semble dépendre plus de la quantité de polysaccharides produite par les cellules ( $R=0,93$ ) que de la magnitude numérique ( $R=0,31$ )(Fig.14 ). Ces résultats indiquent que les souches qui produisent le plus d'exopolysaccharides sont celles qui forment les plus grandes colonies, même lorsque leur taux de croissance est plus élevé comme c'est le cas pour les souches P28N et P09N .

Les exopolysaccharides (EPS) excrétés en quantités remarquables par certaines souches présentent une consistance variable au contact de la pointe d'une pipette Pasteur: mucilagineuse, visqueuse ou gluante.

Sur milieu YEMA additionné de rouge Congo, le centre des colonies des souches testées prennent une coloration rose ou orange due à une légère adsorption de ce colorant aux cellules. Une forte absorption de rouge Congo par les cellules bactériennes, se traduisant par la formation de colonies rouges, est considérée comme incompatible avec la nature des *Rhizobium* (Vincent, 1981; Jordan, 1984). C'est pour cette raison que le rouge Congo est utilisé systématiquement dans les milieux de culture destinés aux *Rhizobium* pour détecter d'éventuels contaminant comme les *Pseudomonas* (Somasegaran et Hobben, 1994).L'absorption du rouge Congo, est un caractère très utilisés comme marqueur de la production de la cellulose chez les souches de *R. leguminosarum* bv trifolii (Ausmess et Jonson 1999).

Cette non-adsorption du rouge Congo n'est cependant pas assez spécifique pour envisager son utilisation exclusive pour la sélection directe des *Rhizobium* à partir d'échantillons de sol.

Certaines souches ont montré, après 3 à 5 jours d'incubation, une tendance à décolorer le milieu YMA au rouge Congo. En effet, initialement de couleur rouge, le milieu YMA-CR se décolore en présence de certaines souches et prend, par endroits, une légère teinte bleue-violacée. Ce virage du rouge Congo qui est un indicateur de pH (zone de virage pH 3,0-5,2) indique que ces souches sont fortement acidifiantes (Young et al., 2001).

### **3-2 Caractéristiques cellulaires**

Les souches examinées se présentent sous la forme de bâtonnets Gram négatif relativement courts et arrondis à leurs extrémités. Les cellules bactériennes sont isolées ou parfois associées en paires et leurs dimensions varient entre 0,5 $\mu$ m à 0,8 $\mu$ m de large pour 1,4 $\mu$ m et 2,6 $\mu$ m de long.

Ces souches sont toutes mobiles et encapsulées et aucune d'entre elles n'a montré la présence de spore.

De gros globules très réfringents, colorés au noir Soudan B, apparaissent chez la plupart des souches après 5 jours d'incubation sur milieu YEMA. Ces globules colorés par une substance lipophile, sont des poly-Beta-hydroxybutyrates (PHB) (Vincent, 1981; Jordan, 1984). Ces PHB constituent une réserve de substrats énergétiques utilisable par les cellules en cas d'absence de substrats carbonés exogènes (Patel et Gerson, 1974). Ces PHB constitueraient jusqu'à 50% du poids sec des bactéroïdes et des *Rhizobiums* (Patel et Wong, 1978).

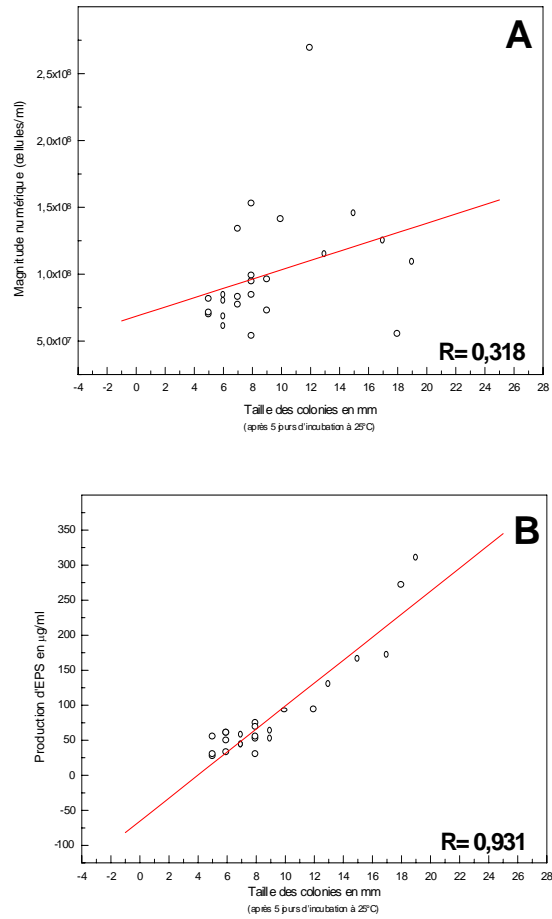
Ils semblent par ailleurs jouer un rôle important dans la fixation d'azote par les bactéroïdes (forme nodulaire des *Rhizobium*) car ce serait leur dégradation, par la Béta-hydroxybutyrate déshydrogénase, qui fournirait directement les substrats réducteurs nécessaires à la diazotrophie en cas de carence en substrats carbonés approvisionnants les nodules (Elmerish, 1985).

En cultures âgées, quelques cellules de la plupart des souches présentent une apparence irrégulière rappelant le pléiomorphisme des bactéroïdes (formes en massue, raquette, T, X et Y). Ces formes constitueraient une rémanence de celles que prennent les *Rhizobium* à l'intérieur des nodules (Vincent, 1981) ou simplement des distorsions cellulaires liées à la présence d'extrait de levure dans le milieu de culture comme rapporté par certains auteurs (Skinner et al, 1977).

### **3-3 Caractéristiques culturelles en milieu liquide**

Les observations décrites ci-dessus en milieu solide ont été confirmées pour l'essentiel en milieu liquide.

Les résultats que nous avons obtenus en milieu liquide (milieu YEMB) confirment que la croissance de nos souches est dans l'ensemble rapide.



**Figure 14** : Relations entre la magnitude numérique (**A**) et la production de polysaccharides extracellulaires (**B**) avec la taille des colonies chez les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii retenues.

**Tableau IX** . Caractéristiques des coloniales des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur milieu YMA et YMA-CR

Souche	Taille En mm	Forme(F), Elévation (E) et Contour (C)			Couleur Sur YMA- CR	Aspect	transparence	Pigmentation et Fluorescence naturelle sur milieu YMA	
		F	E	C				PIGM	FLUO
<b>P28T</b>	6	c	cx	r	Orange	B	++	-	-
P09T	5	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P10T	9	c	cx	r	Rose	B	++	-	-
P06T	17	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P08T	13	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P27T	6	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P29T	8	c	cx	r	Rose	B	+++	-	-
P12T	7	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P15T	6	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P13T	7	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P20T	15	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P22T	10	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P24T	8	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P30T	6	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P03T	5	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P11T	5	c	cx	r	Rose	BT	+/-	-	-
P04N	8	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P28N	19	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P09N	18	c	cx	r	Rouge	BT	+	-	-
P10N	9	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P06N	8	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P27N	12	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-
P08N	8	c	cx	r	Orange	BT	+	-	-
P29N	7	c	cx	r	Rose	BT	+	-	-

c:circulaire, cx:colonies convexes, r :contour régulier, **BT** :Blanchâtre et translucide

En effet, leur temps de génération en milieu YEMB à pH7 et à 25°C, varie entre 1,1h pour les souches P06N, P08T, P28T qui se révèlent celles présentant la croissance la plus rapide et 2,3h pour la souche P10T qui présente la croissance la plus lente.

En dehors de ces extrêmes, la plupart des souches montrent un temps de génération situé entre 1 et 2h avec une moyenne de 1,67h pour l'ensemble du souchier et ce en accord avec les données de la littérature qui situent le temps de génération des souches de *R leguminosarum* bv trifolii entre 2 à 3h (Elkan, 1992; Walker, 1994).

La magnitude numérique atteinte par nos souches après 3 jours d'incubation varie entre  $0,53 \cdot 10^6$  et  $2,69 \cdot 10^8$  avec une moyenne toutes souches confondues de  $10^8$  cellules totales/ml. Elle correspond à une biomasse protéique cellulaire moyenne de 102,2 µg de protéines/ml. Les deux paramètres retenus pour l'évaluation de la croissance, biomasse protéique et magnitude numérique cellulaires, se sont révélés fortement corrélés ( $R=0,80$ ) indiquant ainsi qu'ils rendent compte de manière similaire du niveau de croissance des souches.

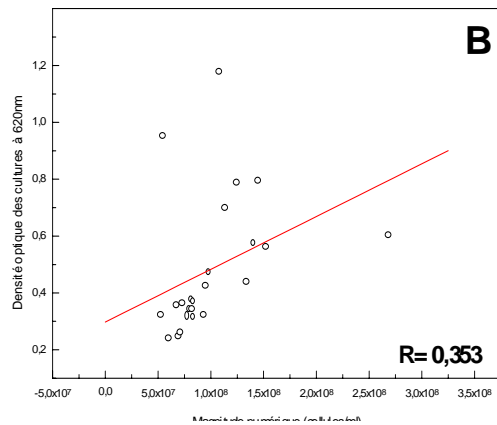
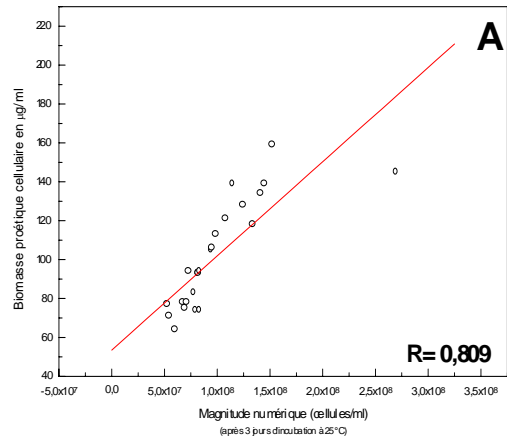
Par contre la lecture directe de la densité optique des cultures semble beaucoup moins satisfaisante pour l'évaluation de la croissance, son niveau de corrélation avec la magnitude numérique des cultures étant nettement plus faible ( $R=0,35$ ) (Fig. 14 ).

La faible corrélation de la densité optique des cultures avec leur biomasse protéique ( $R=0,35$ ) est à mettre au compte des EPS excrétés dans le milieu. En effet la structure macromoléculaire de ces EPS ainsi que les quantités produites étant de nature à augmenter substantiellement la turbidité du milieu (Noureddine, 1998).

En milieu YMB, la croissance des souches étudiées s'est traduite dans pratiquement tous les cas par une acidification significative du milieu. Après 7 jours d'incubation, le pH final du milieu varie entre pH 3,4 et pH 5,4. Le pH final du milieu YMB est en moyenne de 4,4 pour le souchier ce qui indique que le niveau d'acidification moyen est de -2,0 unité de pH.

**Tableau X** . Caractéristiques des cultures de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii en milieu YMb

Souche	Magnitude numérique/ml	Biomasse protéique/ug/ml	TG en heures	Taux de croissance	PH final du milieu	Densité optique à 620nm
<b>P28T</b>	8,35 <sup>E7</sup>	73,56	1,12	0,89	3,63	0,31
P09T	8,14 <sup>E7</sup>	93,1	2,24	0,45	4,25	0,37
P10T	7,32 <sup>E7</sup>	94,25	2,34	0,43	4,60	0,36
P06T	1,25 <sup>E8</sup>	127,59	1,40	0,73	4,78	0,79
P08T	1,14 <sup>E8</sup>	139,08	1,12	1	3,72	0,70
P27T	6,78 <sup>E8</sup>	78,16	2,15	0,89	4,69	0,35
P29T	5,33 <sup>E7</sup>	77,01	1,96	0,47	5,13	0,32
P12T	8,26 <sup>E7</sup>	93,10	1,78	0,51	4,78	0,34
P15T	6,04 <sup>E7</sup>	64,37	1,40	0,56	3,69	0,24
P13T	7,75 <sup>E7</sup>	82,76	1,78	0,71	4,69	0,32
P20T	1,45 <sup>E7</sup>	134,48	1,50	0,56	4,60	0,80
P22T	1,41 <sup>E8</sup>	94,25	1,78	0,67	5,13	0,57
P24T	7,98 <sup>E8</sup>	73,56	2,15	0,56	5,49	0,37
P30T	6,96 <sup>E7</sup>	78,16	1,78	0,57	3,81	0,34
P03T	9,39 <sup>E7</sup>	74,71	2,15	0,46	4,69	0,26
P11T	5,49 <sup>E7</sup>	104,60	1,78	0,56	4,25	0,27
P04N	9,56 <sup>E7</sup>	120,69	1,68	0,59	4,16	0,32
P28N	1,08 <sup>E7</sup>	71,26	1,40	0,71	3,63	1,18
P09N	5,49 <sup>E8</sup>	105,75	1,78	0,56	5,04	0,95
P10N	9,56 <sup>E7</sup>	158,62	1,59	0,63	4,60	0,42
P06N	1,53 <sup>E7</sup>	159	1,12	0,89	3,45	0,56
P27N	2,96 <sup>E8</sup>	144,83	1,31	0,76	4,07	0,60
P08N	9,88 <sup>E7</sup>	112,64	1,50	0,67	4,87	0,47
P29N	1,34 <sup>E8</sup>	118,39	1,40	0,71	4,25	0,44
<b>Moyenne</b>	1,00 <sup>E8</sup>	102,25	1,67	0,62	4,42	0,48



**Figure 15** : Relations entre la magnitude numérique (A) et la densité optique à 620nm (B) des cultures des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii retenues avec la biomasse protéique cellulaire.

En effet, la croissance de la majeure partie des souches et espèces de *Rhizobium* s'accompagne par une acidification plus ou moins intense du milieu. Cette acidification est due à l'accumulation dans le milieu de protons et de déchets métaboliques divers (Graham, 1992; Walker, 1994, Pirt, 1975).

### **3-4 Production de polysaccharides**

La prolifération des souches de *R leguminosarum* bv trifolii s'accompagne par une production de polysaccharides extracellulaires révélés par l'augmentation de la teneur de leurs surnageant de culture en sucres totaux (Tab .XI ).

Le niveau de production varie entre 26 et 311 $\mu$ g d'équivalent glucose/ml respectivement pour la souche P11T et la souche P28N. Le niveau de production moyen du souchier est quant à lui de 86 $\mu$ g d'équivalent glucose/ml.

Les variations dans la synthèse en EPS des cultures sont mieux traduites par l'estimation de leur productivité par unité protéique. Le niveau de productivité des cellules de nos souches varie entre 0,27 et 3,81 $\mu$ g d'EPS/ $\mu$ g de protéines indiquant que le potentiel de synthèse des cultures est à biomasse égale, variable d'une souche à l'autre (Noureddine 1998).

Les cellules de la souche P09N se sont révélées les plus productives alors que celles de la souche P04N sont les moins productives. La productivité moyenne des cellules du souchier est de l'ordre de 0,85 $\mu$ g d'EPS/ $\mu$ g de protéines.

Les polysaccharides produits par nos souches se sont révélés chargés négativement puisqu'ils sont capables de précipiter le bleu alcian (BA), un colorant cationique. Le niveau de charge des EPS produits par nos souches varie par ailleurs entre 8,83 $\mu$ g de BA/mg d'EPS pour la souche P20T et 37,55 $\mu$ g de BA/mg d'EPS pour la souche P12T.

**Tableau XI.** Niveau de production et caractéristiques principales des polysaccharides extracellulaires produits par souches de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii en milieu YEMB

Souche	Niveau de production en ug/ml	HPM	BPM	Richesse relative en HPM	Productivité ug EG/ug protéines	Charge anionique
<b>P28T</b>	49,73	35,63	12,56	73,93	0,68	14,36
P09T	55,64	49,40	13,83	78,13	0,60	15,46
P10T	50,73	42,78	11,81	78,37	0,54	30,59
P06T	170,45	136,94	46,12	74,81	1,34	23,19
P08T	130,09	130,75	31,67	80,50	0,94	23,96
P27T	60,36	51,70	22,60	69,58	0,77	11,04
P29T	51,09	40,00	16,74	70,50	0,66	9,94
P12T	44,09	32,49	8,83	78,62	0,47	8,83
P15T	32,36	33,06	10,80	75,38	0,50	7,73
P13T	44,27	47,19	9,90	82,66	0,53	12,15
P20T	164,91	131,81	30,19	81,36	1,19	37,55
P22T	92,09	64,44	18,95	77,27	0,68	23,19
P24T	53,36	43,14	9,28	82,30	0,57	16,56
P30T	59,45	34,24	16,78	67,12	0,81	18,77
P03T	28,36	29,36	11,89	71,17	0,36	19,88
P11T	26,09	21,02	9,51	68,85	0,35	23,19
P04N	28,36	30,40	11,75	72,13	0,27	24,29
P28N	311,36	267,32	57,86	82,21	2,58	25,40
P09N	271,36	240,69	95,71	80,12	3081	12,15
P10N	61,64	67,41	16,02	80,80	0,58	9,94
P06N	67,45	67,60	17,86	79,10	0,43	8,83
P27N	92,36	75,07	22,91	76,62	0,64	18,77
P08N	72,82	67,37	18,83	78,15	0,65	17,67
P29N	56,64	52,40	14,95	77,80	0,48	15,46
Moyenne	86,46	74,67	20,89	76,56	0,85	17,87

Le fractionnement des EPS produits par nos souches en éléments polysaccharidiques à haut poids moléculaire (EPS-HPM) et en éléments à bas poids moléculaire (EPS-BPM) (Tab.XI) indique que pour toutes les souches examinées, la fraction polysaccharide à HPM est nettement prédominante puisqu'elle représente entre 67% et 82% des EPS totaux avec une moyenne toutes souches confondues de 76,5%.

La prédominance des EPS-HPM dans les polysaccharides extracellulaires synthétisés par *R leguminosarum* bv *trifolii* est bien établie (Sholten-Koerselman, 1979; Breedveld et al., 1990; Zevenhuizen, 1990). Les éléments polysaccharidiques à haut poids moléculaire (EPS-HPM) seraient représentés chez *R leguminosarum* bv *trifolii* par un polymère dont la composition et la structure sont présentées plus loin

### **3-5 Caractéristiques physiologiques**

En milieu YMA reparti en gélose profonde, toutes les souches prolifèrent abondamment en surface (0 à 2cm) et d'une façon satisfaisante en profondeur (2 à 5cm), ce qui indique que les souches testées sont aérobies strictes mais peuvent se contenter, si nécessaire, d'une faible pression partielle en oxygène. Ces résultats, sont en accord avec le caractère d'aérobies stricts et micro aérophile qu'attribue la littérature aux *Rhizobium* (Jordan, 1984).

Toutes les souches examinées ont montrées une activité catalasique et oxydasique positive (VINCENT, 1981). La production d'H<sub>2</sub>S, la formation du 3 cétolactose à partir du lactose et la précipitation du calcium glycérophosphate n'a pu être mise en évidence chez aucune des souches examinées.

### **3-6 Profil de réponse aux conditions physiologiques extrême**

La température est un facteur déterminant pour la survie et la persistance des *Rhizobium* dans les sols (Lowendorf, 1980; Pueppke, 1986). Ce facteur joue également un rôle clé pour le niveau de compétitivité des souches notamment en modulant leur mobilité, donc leur réponse chimiotactique.

Nos souches se sont montrées dans l'ensemble sensible aux températures extrêmes d'incubation. En effet, aucune d'entre elle n'est capable de croître à 37°C et seulement 3 des 24 souches examinées (12%) prolifèrent à 5°C (Tab.XII ).

Comme toutes les bactéries du sol, les *Rhizobium* sont des organismes mésophiles dont la croissance est rapidement inhibée par l'élévation ou la diminution de la température d'incubation (Vincent, 1981; Jordan 1984).

Parallèlement à l'effet de la température sur la croissance, nous avons déterminé en parallèle à 10°C et à 30°C, son effet sur les capacités motrices des souches testées. Nos résultats indiquent que 81% des souches arrivent à maintenir leur mobilité à 10°C. Cette proportion chute à seulement 15% à 30°C. La mobilité des souches issues de la variété Tigri s'est montrée dans l'ensemble moins affectée à 30°C que celle des souches provenant des nodosités des plantules la variété Nungarin .

Nos soucehs se sont révélées dans 56% des cas capables de proliférer à pH 5 cette proportion est légèrement supérieure à pH 9 puisque 62,5M% prolifèrent dans ces conditions. Les osuches de la variété tigri ont montré une tolérance nettement supérieure vis-à-vis de l'acidification (10/16) et de l'alcalinisation (12/16) du milieu que les souches de variété nungarin (4/8).

Neuf (09) soucehs (P06T, P08T, P29T, P13T, P20T, P22T, P24T, P30T et P29T) parmi les 24 testées se sont révélées tolérantes aussi bien à l'acidité (pH5) qu'alcalinité (pH9). Nous remarquons que parmi ces dernières huit (08) proviennent de la variété tigri et une seule (P29N) de la variété nungarin.



Caractères		Variété d'origine des souches		Moyenne
		Tigri	Nungarin	
Croissance aux températures extrêmes	5°C	6,2	25	<b>15,6</b>
	37°C	12,5	12,5	<b>12,5</b>
Mobilité aux températures extrêmes	10°C	87,5	75	<b>81,25</b>
	30°C	18,7	12,5	<b>15,6</b>
Croissance aux pH extrêmes	pH5	62,5	50	<b>62</b>
	pH9	75	50	<b>62,5</b>
Croissance en présence de NaCl	0,5M	75	100	<b>87,5</b>
	1M	65,2	25	<b>40,6</b>
	2M	0	0	<b>0</b>
Croissance en présence de KCl	0,5M	62,5	62,5	<b>62,5</b>
	1M	31,2	25	<b>28,1</b>
	2M	0	2	<b>0</b>

Les souches de la variété Tigri ont montré une tolérance plus élevée (75%). En effet, (18/24) 62% d'entre elles prolifèrent en présence de 500mM de NaCl ou de KCl, des concentrations qui déterminent des niveaux de salinité relativement élevés (Tab.XII). Résultat qui laisse indiquer que le KCl a un effet plus drastique que le NaCl (Czonka 1991, Yancey, 1994).

Cette bonne tenue de nos souches vis à vis de la salinité est confirmée par leur comportement en présence de 1M de NaCl et de KCl, conditions dans lesquelles environ 1/3 (28%) de nos souches est encore capable de proliférer.

Par rapport aux données de la littérature qui considèrent que la limite de tolérance les souches de *R leguminosarum* bv *trifolii* à la salinité n'excéderait pas 0,4M de NaCl, nos souches se caractérisent donc par un niveau de tolérance relativement élevé.

Niveau de tolérance qui semble indiquer que les sols d'Algérie, pour la plupart affectée par un excès de sels solubles ne serait ce que pendant la saison estivale, lorsque la dessiccation du substrat édaphique concentre les sels dans la phase liquide du sol, hébergent des souches de *R leguminosarum* bv *trifolii* adaptées à cette contrainte.

### 3-7 Profil d'utilisation des substrats carbonés

Nos souches peuvent utiliser une large gamme de substrats carbonés incluant les polyols, les disaccharides, les monosaccharides, les acides aminés et les acides organiques (Tab. XIII ).

Le glucose (100%), le maltose (100%) et dans une moindre mesure le saccharose (87%) et le lactose (80%) sont les sources de carbone les plus largement utilisées et peuvent donc remplacer avantageusement le mannitol plus onéreux pour la production en masse des *Rhizobium*.

Lorsqu'on considère les souches en fonction de leur plante hôte d'origine, nous remarquons que les souches issues de la variété Tigri se distinguent de celles des autres souches par un spectre d'utilisation plus large des substrats carbonés. Supériorité particulièrement marquée dans le cas des disaccharides et des acides aminés.

Par ailleurs, Les souches issues de la variété Tigri se sont révélées capables d'utiliser le tréhalose alors qu'une seule des souches de la variété nungarin (P06N) présente cette capacité.

Les souches issues de la variété Tigri apparaissent comme plus compétentes sur le plan saprophytique que celles issues des autres variétés. Cette meilleure compétence saprophytique permettrait aux souches issues de la variété Tigri de mieux se maintenir et proliférer dans le sol et dans la rhizosphère, les rendant ainsi plus compétitives pour la colonisation du système racinaire de la plante hôte (Van de Sande et Bisseling, 1997; Knee et al., 2001).

**Tableau XIII : utilisation des substrats carbonés par les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* retenues pour l'étude microbiologique. Les résultats détaillés relatifs aux acides aminés et aux acides organiques figurent en annexe..**

Caractères	Souches																														
	P28-TI	P09-TI	P10-TI	P06-TI	P08-TI	P27-TI	P29-TI	P12-TI	P15-TI	P13-TI	P20-TI	P22-TI	P24-TI	P30-TI	P03-TI	P11-TI	P04-NU	P28-NU	P09-NU	P10-NU	P06-NU	P27-NU	P08-NU	P29-NU	LBS-107	RLBV01	RLBV02	RLBT01	RLBT02	RMEL01	RMEL02
<b>Polyols</b>																															
Adonitol	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Arabinol	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Erythrol	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Inosito	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Arabitol	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Dulcitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Erythritol	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Glycéro	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ribitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Monosaccharides</b>																															
Arabinose	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Fructose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Fucose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Melizitose	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Xylose	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Disaccharides</b>																															
Lactose	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Saccharose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Sorbose	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Substrats carbonés	Variété d'origine des souches		Moyenne
	Tigri	Nungarin	
Polyols	69,4	65	<b>67,4</b>
Monosaccharides	72,9	58,3	<b>65,6</b>
Disaccharides	71,8	51,2	<b>61,5</b>
Acides aminés	54,9	50	<b>52,4</b>
Acides organiques	54,7	58,3	<b>56,5</b>
Moyenne tous substrats confondus	<b>64,6</b>	<b>56,5</b>	<b>60,60</b>

### 3-7 Profil de résistance aux agents antibactériens

Nos souches sont relativement sensibles au panel d'agents antibactériens que nous avons testés (Antibiotiques, colorants et métaux lourds) (Tab XIV). En effet, la proportion des souches qui se sont montrées capables de croître en présence de ces composés s'est révélée inférieure à 45%. Des trois catégories d'antibactérien utilisés, les métaux lourds semblent être les composés pour lesquels notre souchier a montré la plus grande sensibilité puisque seulement 25% des souches examinées prolifèrent en présence de ces composés.

Nos résultats qui décrivent une sensibilité des souches du biovar trifolii sont en accord avec la littérature qui rapporte que sur un groupe de *R leguminosarum*, les souches du bv trifolii sont résistantes à des concentrations qui peuvent dépasser 2,5mM en Cobalt, Nickel et Zinc (Smith et al., 1998). Ceci constitue un critère intéressant lors la sélection de des souches de *Rhizobium* pour l'inoculation des sols affectés par les métaux lourds (Steritt et Lester, 1980; Sato et al., 1986; Biro et al., 1995 ; Zahran, 1999).

La sensibilité de nos souches vis à vis des agents antibactériens s'est montrée plus faible avec les colorants et les antibiotiques, puisque respectivement 59% et 43% d'entre elles ont exprimé leur potentiel prolifératif en présence de ces agents antibactériens.

Dans le cas des métaux lourds, le Cobalt s'est montré le plus toxique vis à vis de nos souches puisque seulement 2 d'entre elles soit 9%, se sont montrées capables de proliférer en sa présence. Le titane et le Magnésium sont à l'inverse les métaux lourds les moins nocifs pour nos souches puisque 68% des souches prolifèrent en leur présence.

Parmi les colorants, le bleu de méthylène avec un niveau de sensibilité de l'ordre 94%, est le colorant qui présente la plus grande activité antibactérienne. A l'opposé, le bleu de bromothymol s'est montré le composé présentant la plus faible activité antibactérienne vis à vis de nos souches avec seulement 10% des souches affectées.

**Tableau XIV : effet des agents antibactériens sur la croissance des souches *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* retenues pour l'étude microbiologique. Les 6 dernières souches représentent les souches de références incluses dans l'étude microbiologiques réalisée en micro-galeries.**

Caractères	Souches																																
	P28-TI	P09-TI	P10-TI	P06-TI	P08-TI	P27-TI	P29-TI	P12-TI	P15-TI	P13-TI	P20-TI	P22-TI	P24-TI	P30-TI	P03-TI	P11-TI	P04-NU	P28-NU	P09-NU	P10-NU	P06-NU	P27-NU	P08-NU	P29-NU	LBS-107	RLBV01	RLBV02	RLBT01	RLBT02	RMEL01	RMEL02		
<b>Antibiotiques</b>																																	
Ac.Nalidixique (50)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-		
Bacitracine (50)	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-		
Chloramphénicol (20)	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
Erythromycine (50)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Gentamycine (10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Penicilline (05)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Streptomycine (10)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
<b>Colorants</b>																																	
B-Bromothymol (750)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
B-méthylène (1000)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
Cristal Violet (20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
V-Malachite (20)	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<b>Métaux lourds</b>																																	
Baryum (2000)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
Brome (1000)	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
Cadmium (10)	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
Chrome (500)	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
Cobalt (10)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Cuivre (20)	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
Lithium (2000)	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
Magnésium (2000)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Manganèse (2000)	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	
Mercure (10)	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Nickel (10)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Plomb (500)	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	
Selenium (300)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	
Titane (20)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Zinc (20)	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+

Classe d'agents antibactériens	Variété d'origine des souches		Moyenne
	Tigri	Nungarin	
Colorants	54,12	65	<b>59,5</b>
Métaux lourds	25,6	26,2	<b>25,9</b>
<b>Moyenne tous agents</b>	<b>41,39</b>	<b>44,68</b>	<b>43</b>

Parmi les colorants, le bleu de méthylène avec un niveau de sensibilité de l'ordre 94%, est le colorant qui présente la plus grande activité antibactérienne. A l'opposé, le bleu de bromothymol s'est montré le composé présentant la plus faible activité antibactérienne vis à vis de nos souches avec seulement 10% des souches affectées.

Pour ce qui est des antibiotiques, la gentamycine s'est révélée celle qui affecte le plus fortement nos souches car seulement 12,5% des souches issues toutes de la variété Nungarin sont insensibles à cet antibiotique.

A l'opposé, la pénicilline est l'antibiotique qui affecte le moins nos souches puisque 87% d'entre elles prolifèrent en sa présence. A l'opposé la streptomycine et la pénicilline se sont montrés avec 87% de résistance, les antibiotiques qui affectent le moins nos souches. D'après les travaux de Smith et *al.* (1998), les souches de *R leguminosarum* bv trifolii peuvent résister à des concentrations différentes d'antibiotiques pouvant aller jusqu'à (200µg/mg) de chloramphénicol, l'érythromycine, la gentamicine et de la streptomycine.

### 3-9 Analyse numérique des profils phénotypiques des souches

l'analyse classique des profils phénotypiques n'a pas permis de mettre en évidence des différences fondamentales entre les souches issues des nodosités des 2 variétés de Bersim, et ce malgré le nombre considérable de caractères pris en considération. C'est l'une des difficultés majeures de l'analyse phénétique classique ou traditionnelle, à savoir que plus le nombre de caractères augmente plus notre possibilité de percevoir des différences entre les taxons diminue. C'est pour cette raison que l'analyse numérique des profils phénotypiques est indispensable puisqu'elle est la seule qui permette une hiérarchisation (clusterisation) des taxons en tenant compte de l'ensemble de leurs caractères et la construction d'une représentation graphique permettant d'appréhender facilement cette dernière.

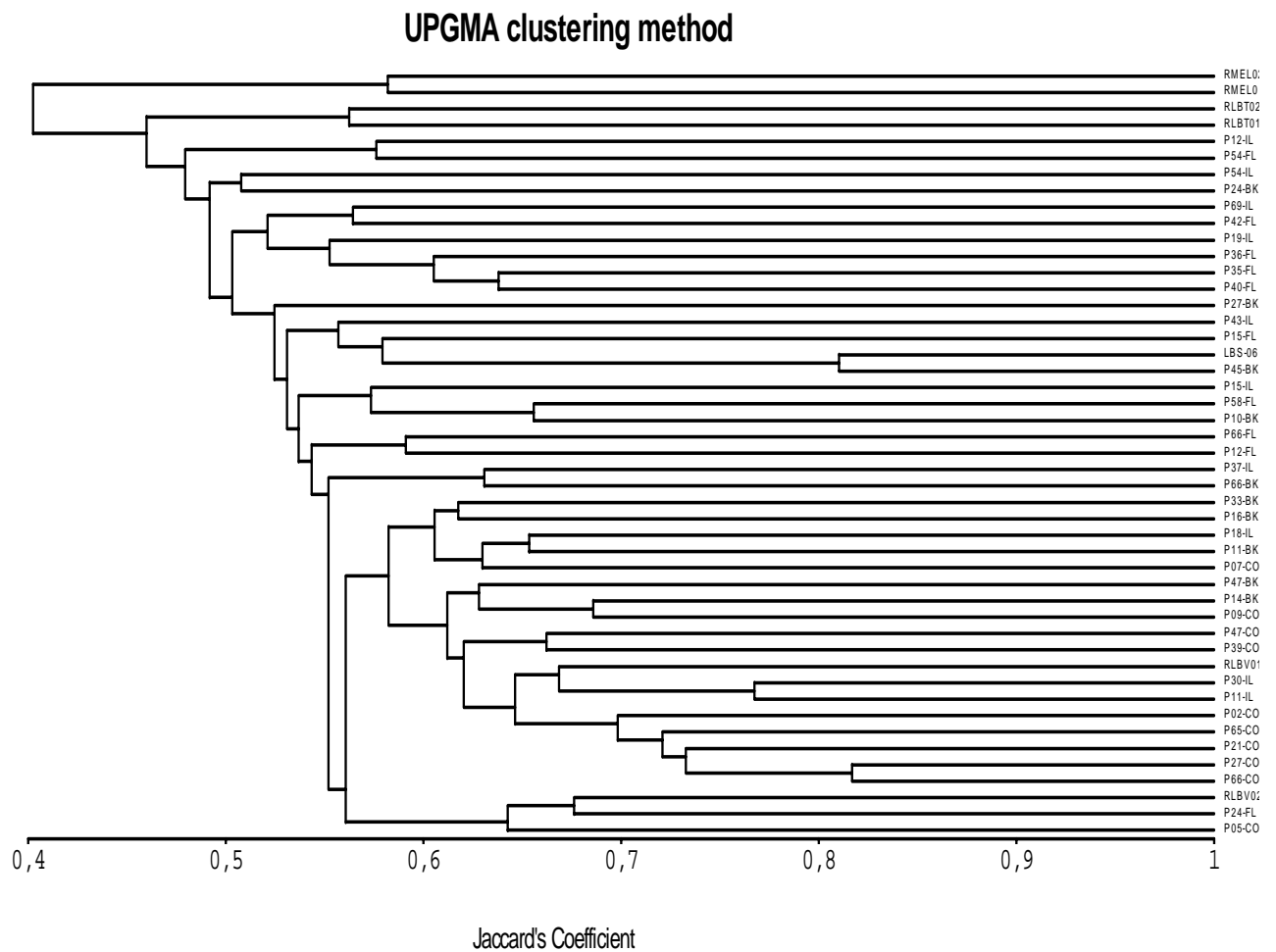
L'analyse numérique des profils phénotypiques des souches testées a permis la construction d'un dendrogramme qui résume graphiquement leur degré de similitude et leur homologie phénotypique (fig. 16).

L'analyse de ce dendrogramme indique que le souchier soumis à l'analyse se subdivise dès la distance phénotypique de 0,40 en deux groupes distincts:

- Un groupe renfermant les 2 souches de références de *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* qui se révèlent ainsi très différentes des souches de l'autre groupe
- Un groupe renfermant toutes les autres souches analysées, à savoir des souches de *Rhizobium leguminosarum* des deux biovars trifolii et viciae qui se révèlent à ce niveau de clusterisation très apparentées.

Le groupe renfermant les souches de *Rhizobium leguminosarum* se subdivise à son tour à une distance de 0,45 (A) en deux groupes::

- Un groupe renfermant les deux souches de *R leguminosarum* bv viciae de références incluses dans cette étude
- Un groupe comportant toutes les autres souches, c'est à dire nos souches de *R leguminosarum* bv trifolii ainsi que les deux souches de références retenues pour ce biovar (RBLT01 et RBLT02).



**Figure 16** : Dendrogramme (UPGMA) montrant la distribution des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* en fonction du niveau de similitude (Jaccard) de leurs profils phénotypiques. (L'échelle figurant en bas de la figure représente le coefficient de similitude de Jaccard ).

Cependant, les deux groupes phénotypiques définis par les souches sélectionnées par les deux variétés de Bersim présentent une bonne diversité intrinsèque, en particulier dans le cas des souches issues des plants de la variété Nungarin. En effet, celles issues de la variété tigris sont plus homogènes comme l'indique le nombre relativement réduit de phénotypes que ces souches définissent. La relative homogénéité de la population de souches issues de la variété tigris laisse indiquer que cette dernière est plus sélective vis-à-vis des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* des sols d'Algérie.

## Conclusion

L'étude des caractéristiques culturelles, biochimiques et physiologiques des 24 souches testées montrent que les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii des sols d'Algérie, présentent des caractéristiques qui sont en accord avec les descriptions communément admises pour cette espèce.

Les souches examinées se présentent toutes sous forme de bâtonnets Gram négatif. Elles sont toutes mobiles et aucune d'entre elles n'a montré de spores. Elles sont à croissance rapide, entraînant une acidification du milieu. Elles produisent des quantités importantes de polysaccharides extracellulaires, responsables de l'aspect muqueux caractéristique des souches de *Rhizobium*.

Les souches testées sont capables d'utiliser une large gamme de substrats carbonés. Ceci permettrait à ces souches de mieux se maintenir, et proliférer dans le sol et dans la rhizosphère, les rendant ainsi plus compétitives pour la colonisation du système racinaire de la plante hôte.

L'analyse numérique a permis de montrer que les souches sélectionnées par les 2 variétés de Bersim sont diversifiées.

Les souches issues de la variété Tigri semblent être plus homogènes contrairement à celles issues de la variété Nungarin ce qui indique que la première est plus sélective vis à vis des souches de *Rhizobium*.

L'ensemble des résultats de l'étude morphologiques, biochimique et physiologique montrent que les souches forment un groupe homogène, qui est en accord avec les descriptions communément admises du genre *Rhizobium*.

La proportion élevée des souches capables de croître a 2M de NaCl semble indiquer que les sols d'Algérie hébergeraient de nombreuses souches adaptées aux conditions pédoclimatiques locales.

L'identification des microorganismes par les méthodes moléculaires apparaît maintenant comme une alternative à l'identification dite classique. L'approche moléculaire est intéressante car elle permet non seulement d'identifier rapidement une bactérie déjà connue, de reconnaître aisément une nouvelle bactérie, mais également de décrire la composition bactérienne (diversité) d'un échantillon sans passer par une étape de culture.

La variété tigris apparaît ainsi nettement plus sélective vis-à-vis des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* des sols d'Algérie. A l'inverse, les souches sélectionnées par la variété Nungarin sont éparpillées au niveau des différents clusters du dendrogramme, indiquant ainsi que cette variété est moins sélective vis-à-vis des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* avec qui elles contractent la symbiose.

---

---

## **conclusion générale**

---

---

## Conclusion générale

---

Malgré ces désavantages, la symbiose *Rhizobium* légumineuses reste un phénomène biologique dont l'utilisation est potentiellement intéressante. Toutes les légumineuses des différentes espèces du genre *Trifolium* que nous avons rencontré lors de nos campagnes de prélèvement, ainsi que les 30 sols étudiés au laboratoire, indiquent que la symbiose avec les *Rhizobium* est répandu dans les sols d'Algérie. Une alternative permettant d'avoir des systèmes biologiques efficaces qui s'inscrivent dans les objectifs de la revalorisation des ressources naturelles, comme visé par la convention de la conservation de la biodiversité (Sommet de Rio 1992), notamment dans le but d'atténuer l'utilisation massive des engrais azotés (Kvien et al., 1981).

Le Bersim bien qu'il représente une espèce d'introduction récente en Algérie ne semble pas présenter une exigence particulière pour établir une interaction symbiotique avec les souches de *R. leguminosarum* bv trifolii.

La majorité des souches issues de l'extraction et du piégeage soit (94%) se sont montrées, *in vitro*, capables de noduler au moins une des deux variétés de bersim testées (Nungarin et Tigri) et de former avec celle-ci des symbioses fixatrices d'azote. Cependant, les souches obtenues via la méthode du piégeage nodulent, *in-vitro*, plus fortement et plus efficacement les plantules de cette espèce que celles provenant des autres espèces de trèfle via la méthode d'extraction.

Nous présumons que la différence dans les réponses des plantes des deux variétés de bersim, s'explique par l'origine des souches. C'est à dire que la variété dans le sol est en face d'un pool diversifié de *Rhizobium*, elle sélectionne

parmi un nombre considérable de *Rhizobium*, ceux avec qui elles sont compatibles et très affines. Contrairement au souchier issu de l'extraction pour qui la plante du bersim se voit imposer une souche compatible de *R leguminosarum* bv trifolii mais pas forcément la meilleure souche pour une meilleure combinaison symbiotique. Les combinaisons souches variété sont d'une importance économique considérable pas seulement pour la quantité en fixation d'azote atmosphérique, mais aussi pour réduire l'utilisation des fertilisants azotés (Kvien et al., 1981). Une réduction effectuée par la bactérisation des semences des les cultures de légumineuses et non légumineuses avec des inoculums à un seul type de souches et/ou multi-souches (mixtes) (Fenton, 1994).

*In vitro*, les facteurs biotiques et abiotiques, particulièrement l'azote à certaines concentrations, sont décrits littéralement avoir un effet néfaste l'établissement de la symbiose. Cependant, la production en biomasse des plantes indique que la nutrition nitratée permet une augmentation des poids de la matière végétale sèche des plantes.

La caractérisation phénotypique (culturelle, biochimique et physiologique) de la collection de souches issues des sols d'Algérie, retenue sont en accord avec celles décrites dans la littérature. l'analyse numérique a permis de montrer que les souches sélectionnées par les 2 variétés de Bersim sont phénotypiquement diversifiées.

Les souches issues Tigri semblent être plus homogènes contrairement à celles issues de Nungarin ce qui indique que cette variété serait plus sélective vis à vis ses souches de *Rhizobium*.

## **Références bibliographiques**

---

---

## Références Bibliographiques

### A

---

ALLEN O.N. et ALLEN E.K. 1980 - The *Leguminosae*: A source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison, 812 p.

AMRANI S. 1988 - Etude de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le Bersim (*Trifolium alexandrinum* Juslen). Thèse de Magister. ISN-USTHB. Alger, 80 p.

AMRANI S., NOUREDDINE N-E., TAGUETT F., HADDADJ A., ZIZI A. et AMRANI F. 2000 - Survey of the *Rhizobium* symbiosis amongst Algerian legumes. Poster présenté à " EuroConference: Molecular Genetics of Model Legumes " - Norwich, Royaume Uni 24-28 Juin 2000.

AUSMEES N., JONSON H., HÖGLUND H., LJUNGGREN H. et LINDBERG M. 1999- Structure and Putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii. *Microbiology*, **145**: 1253-1262.

### B - C

---

BAUER W.D. 1981- Infection of legumes by Rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **75**:407-449.

BAYOUMI H.E.A.F., BIRO B., BALZSY S. et KECSKES M. 1995- Effects of some environmental factors on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **42**:61-69.

BECKER A. et PUHLER A. 1988- Production of exopolysaccharides. In " **The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant associated bacteria**". Spaink H.P. Kondorosi A. et Hooykaas P.J.J. (Eds.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Pays-Bas, 566 p.

BERGERSEN F.J. 1982 - **Root nodules of legumes: structure and function**. Research Studies Press. Letchworth. 135 p.

BERGUM A.A., LEIBOVITCH S., MIGNER P. et ZHANG F. 2001 - Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*pisum sativum* L.) and Lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot. Jul.* **52**:1537-1543.

BERNAL G. et GRAHAM P.H. 2001 - Diversity in the Rhizobia associated with *phaseolus vulgaris* in Ecuador and comparisons with Mexican bean Rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **47**:526-534.

- BIRO B., BAYOUMI H.E., BALAZSY S. et KECSKES M. 1995 - Metal sensitivity of some symbiotic N<sub>2</sub> fixing bacteria and Pseudomonas strains. *Acta. Biol. Hung.* **46**:9-16.
- BLOOM A.J. 1995- Nitrogen dynamics in plant growth systems. *Life Bioph. Sci.* **3**:35-41.
- BREEDVELD M.W. et MILLER K.J. 1988 - Cell surface glucans. In "**The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant. Associated Bacteria**". Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. (Eds.) Kluwer Academic publisher, Dordrecht, Pays-Bas. pp. 81-96.
- BROUGHTON W.J. et PERRET X. 1999 - Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:305-311.
- BEAUCHAMP C.J. 1993- Mode d'action des Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agents de lutte biologique. *Phytoprot. Rev.* **74**:19-27.
- Biolog 1993 - **MicroStation System** - Release 3.50 (User's Manual). Biolog Inc., Hayward, USA, pp. 1-202.
- BERGERSEN F.J. 1970 - The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**:1015-1025.
- BLADERGROEN M.R. et SPAINK H.P. 1998 - Genes and signal molecules involved in the Rhizobia-Leguminosae Symbiosis. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **4**:453-359.
- BRADFORD M.M. 1976 - A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* **72**:248-254.
- BROCKWELL J. et BOTTOMLEY 1995- Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil. Biol. Biochem.* **27**:683-697.
- BRYANT T.N. 1993 - FREAK: A program for analysing microbial binary Characteristics. <http://medstats.soton.ac.uk/software/freak1.exe>.
- BURTON J.C. 1976 - Problems in obtaining adequate inoculation of soybean. In "**World Soybean Research**". Hill L.D. (Ed.). The Interstate Printers and Publishers Inc. Danville, USA, pp 170-179.
- CORZO J., SANTAMARIA M. et GULTIERREZ A.M. 1997 - Transient Energy Coupling Between Rhizobia and Legume Cells Mediated by the Peribacteroid Membrane ATPase Proton Pump. *Biosc. Reports* **17**:390-400.
- COURTOIS B., DERIEUX J.C. et HORNEZ J.P. 1975 - Etude des polyosides de *Rhizobium* à croissance rapide. *Ann. Microbiol.* **126**:1-15.
- CSONKA L.N. 1991- Prokaryotes osmoregulation: Genetic and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**:121-147.

## D

---

- DATE R.A. 1970 - Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. *Plant Soil* **32**:703-725.
- DAZZO F.B. et HUBBEL D.H. 1982 - Control of root hair infection.

Dans "**Nitrogen fixation**". Broughton W.J. (Ed.). Oxford University Press, Madison, USA. pp. 274-310.

DEBELLE F., MOULIN L., MANGIN B., DENARIE J. et BOIVIN C. 2001 - Nod genes and nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochem. Pol.* **48**:359-65.

De LAJUDIE P., LAURENT-FULELE E., WILLEMS A., TORCK U., COOPMAN R., COLLINS M.D., KERSTERS K., DREYFUS B. et GILLIS M. 1998 - *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1277-1290.

De Los SANTOS E. P., BUSTILLOS-CRISTALES R. et CABALLERO-MELLADOJ 2001- *Bulkholderia*, a genus rich in plant associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2790-2798.

DENARIE J., DEBELLE F. et ROSENBERG C. 1992 - Signal and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:497-531.

DJORDJEVIC M.A., GABRIEL D.W. et ROLFE B.G. 1987- *Rhizobium* : The refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopatol.* **25**:145-168

DREVON J.J., DERANSARI C., IREKTI H., PAYRE H., ROY G. et SERRAJ R. 1995 - La salinité (NaCl) abaisse la conductance des nodosités de légumineuses à la diffusion de l'oxygène.

DREYFUS B. 1988 - Characterisation of *Azorhizobium caulinodans*, gen. nov. - sp.nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:89-98.

DREYFUS B.- *Sesbania rostrata* et *Medicago arborea*: des légumineuse fixatrices d'azote.  
<http://www.ird.fr/inst/actualites/dossiers/jardin/legumine.shtml>

DOUKA C.E., NYCHAS A.E et XENOULIS A.C. 1986 - Nitrogen fixation in soybean as influenced by cultivar and *Rhizobium* strain differences. *Biol. Fertil. Soils.* **2**:113-118.

DOVEL R.L., VIETOR D.M. et WEAVER R.W. 1993 - Effects of media N content and rhizobial strain on N<sub>2</sub> fixation and partitioning in *Leucaena* seedling. *J. Range. Manag.* **46**:512-515.

DOWLING D.N. et BROUGHTON W.J. 1986 - Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:131-157.

## E - F

---

ELKAN G.H. 1992 - Taxonomy of the Rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **38**:446-450.

ELMERICH C. 1997- Nitrogénase: aspects biochimiques, moléculaires et génétiques. Dans "**Assimilation de l'azote chez les plantes**", Morot-Gaudry J.F. (Ed.). INRA, Paris, France. pp 163-177.

EVANS L.S., LEWIN K.F. et VELLA F.A. 1980 - Effect of nutrient medium pH on symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*. *Plant Soil.* **56**:71-80.

FAITURI M.Y., EL MAHI Y.E. et EL HASSAN G.A. 2001 - Effect of some salt and sodicity on the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain isolated from salt affected soil. *Can. J. Microbiol.* **47**:807-812.

FENTON M. 1994 - The expression in soil bacteria of symbiotic genes from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Monography of the Dept of Microbiology and Genetic, Massey University. Nouvelle Zélande. pp. 1-9.

FISCHER H.M. 1994 - Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Micobiol. Rev.* **56**:352-386

FOBERT et al., 1991 in TRIPLETT E.C., SADOWSKY M.J. 1992 -Genetics of competition for nodulation of Legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:399-428.

FRANSSSEN H.J., VIJN I. et YANG W.C. et BISSELNG T. 1992 - Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molec. Biol.* **19**:89-107.

FREIRE J.R.J. et KOOLING I. 1986 - World culture collections of *Rhizobium*. *Micobiol. Rev.* **58**:352-386.

## G

---

GALL H.T., HEICHEL G.H. et BARNES D.K. 1987 - Photosynthate partitioning in plants of Alfalfa selected for high and low nodule mass. *Crop. Sci.* **27**:96-100.

GEST H. 1999 - Bacterial classification and taxonomy: A primer for the new millennium. *Microbiology Today*, **26**:70-72.

GEURTS R. et FRANSSSEN H. 1996 - Signal transduction in *Rhizobium* induced nodule formation. *Plant Physiol.* **112**:447-453.

GRAHAM P.H. 1992 - Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**:475-483.

GUALTIERI G. et BISSELING T. 2000 - The evolution of nodulation. *Plant. Molec. Biol.* **42**:181-194.

GUINOCHET M. et De-VILMORIN R. 1984 - Flore de France - (Fascicule 5. Editions du CNRS, Paris, France. pp. 1688-1787.

## H

---

HADDADJ A. 2002 - La formation des nodosités à *Rhizobium*chez quelques légumineuses cultivées: Aspects chimiotaxiques et cellulaires. Thèse de Magister, Institut National Agronomique Alger. 143 p.

HALBEIB C.M. et LUDDEN P.W. 2000 - Regulation of biological fixation. *J. Plant. Nutr.* **42**:1081-1084.

HAMADACHE A., SAOULI-MANTOUCHE M. et BOUSSADI M. 1998 - Les fourrages verts: un impératif au développement de la production laitière. Résultats des travaux de recherche sur le trèfle d'Alexandrie. *Céréaliculture* **32**:6-9.

HANSON R.S. et PHILLIPS J.A. 1984 - Chemical composition. Dans "**Manual of methods for general bacteriology**". Gerhardt P. (Ed.). American Society For Microbiology, Washington DC., USA. pp. 224-328.

HANSMAN P., MAERZ M. et SITTE P. 1989 - **Progress in Botany**. (Vol 51). Behnke D., Hesser R., Kubitzki K., Rumuge M. et Ziegler H. (Eds.) Berlin. Allemagne. 277 p.

HARDISON R. 1999 - The evolution of hemoglobin. *American Scientist*. **87**:126-137.

HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JAKSON E.K. et BURNS R. C. 1968 - The Acetylene-ethylene assay for Nitrogen fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant. Physiol.* **43**:1185-1207.

HARDY R.W.F. 1993 - Biological nitrogen fertilization: Present and future applications. Dans "**Agriculture and Environmental Challenges**". Srivastava J.P. et Aldermans H. (Eds.). Proceedings of the 13th Agricultural Sector Symposium. The World Bank. Washington DC., USA. pp. 109-117.

HARTWIG U., BOLLER B. et NOSBERGER J. 1987 - Oxygen supply limits nitrogenase activity of clover after defoliation. *Ann. of botany* **59**:285-291.

HIRSCH A.M. 1992 - Developmental biology of nodulation. *New Phytol.* **122**:211-237.

HIRSCH A.M. et La RUE T.A 1997 - is the nodulation a modified root or stem or an organ Sui generis?. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **16**: 361-392.

HOLMES B., PINING C.A. et DAWSON C.A. 1986 - A probability matrix for the identification of Gram-negative, aerobic, non-fermentative bacteria that grow on nutrient Agar. *J. Gen. Microbiol.* **132**:1827-1842.

HUNT S. et LAYZELL D.B. 1993 - Gas exchange of legume nodules and regulation of Nitrogenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**:483-511.

## I - J

---

JEBARA M., M'HAMDI R., AOUNI M. E., GHRIR R. et MARS M. 2001 - Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Can. J. Microbiol.* **47**:139-147.

JORDAN D.C. 1984 - Family III: *Rhizobiaceae*. Dans "**Bergey's manual of systematic bacteriology**" 9eme édition, vol. 1A, Krieg N.R. et Holt J.C. (Eds.). Williams et Wilkins, Baltimore, USA. pp. 234-244.

JIANG G. et KRISHNAN H.B. 2000 - *Sinorhizobium fredii* USDA257, a cultivar-specific soybean symbiont, carries two copies of y4yA and y4yB, two open reading frames that are located in a region that encodes the type III protein secretion system. *MPMI*. **13**:1010-1014.

JORDAN D.C. et ALLEN O.N. 1974 - Family III: *Rhizobiacea*. Dans "**Bergey's manual of systematic bacteriology**", 8ème édition, vol. 1A, Krieg N.R. et Holt J.C.(Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA. pp. 345-358.

## K

---

KACI Y. 1988 - Etude des bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* var Waha). Thèse de Magister, ISN-USTHB. 140p.

KIJNE J.W. 1992 - The *Rhizobium* infection process. Dans "**Biological nitrogen fixation**" Stay G., Burris R.H. et Evans E. (Eds). Chapman et Hill. New York, USA. pp. 349-398.

KIM J. et REES D.C. 1994 - Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **33**:389-397.

KNEE G.M., GONG F. C., GAO M., TEPLITSKI M.M., JONES A.R., WORTHY F.A., MORTAJ R. et BAUER W.D. 2001 - Root mucilage from Cowpea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *MPMI*. **14**:775-84.

KOCH B. et EVANS H.J. 1966 - Reduction of acetylene to ethylene by soybean nodule. *Plant. Physiol.* **41**:1748-1755.

KOHL D.H., REYNOLDS P.H.S. et SHEAVER 1989 - Distribution of N<sup>15</sup> within Pea, Lupin and Soybean Nodules. *Plant Physiol.* **90**:420-426.

KOVACH W.L. 1993 - MultiVariate Statistics Package (MVSP), version 2.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, Royaume-Uni. 172 p.

KULKARNI S., SURANGE S., SHEKHAR NAUTIYAL C. 2000 - Crossing the limits of *Rhizobium* Existence in Extreme Condition. *Curr. Microbiol.* **41**:402-409.

KVIEN C.S., HAM G.E. et LAMBERT J.W. 1981 - Recovery of introduced *Rhizobium japonicum* Strains by Soybean Genotypes. *Agron. J.* **74**:900-905.

## L

---

LEMANCEAU P. et HEULIN T. 1998 - La rhizosphère. Dans " **Sol:Interface fragile**". Stengel P. et Gerin S. (Eds.). INRA. Paris, France. pp. 93-106.

LE RUDULIER D. et BERNARD T. 1986 - Salt tolerance in *Rhizobium*: A possible role for betaines. *FEMS. Microbiol. Rev.* **39**:69-72.

LIE T.A. 1982 - Environmental physiology of the legume-*Rhizobium* symbiosis. Dans "**Nitrogen fixation, Vol.1, Ecology**", Broughton W.J. (Ed.). Oxford University Press. pp 104-134.

LINDSTRÖM K. 1989 - *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:365-369.

LINDSTRÖM K. 1995 - Numerical taxonomy as a tool for the classification of root-nodule bacteria. Binary Lindstrom. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:623-633.

LÖHNIS F. et HANSEN R. 1921 - Nodule bacteria of leguminous plants. *J. Agro. Res.* **20**:543-556.

LOWENDORF H.S. 1980 - Factors affecting survival of *Rhizobium* in soils. *Adv. Microbiol. Ecol.* **4**:87-124.

## M

---

MALEK W. 1992 - The role of motility in the efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* **158**:26-29.

MARTENSSON A.M. et LJUNGGREN H.D. 1984 - A comparison between the acetylene reduction method, the isotope dilution method and the nitrogen method for the measurement of nitrogen fixation in Lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant. Soil.* **81**:177-184.

MARTINEZ-ROMERO E. 1994 - Recent development in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil*. **161**:11-20.

MATEOS P.F., BAKER D.L., PETERSEN N., VELEZQUEZ E., JIMENEZ-ZURDO J.I., MARTINEZ-MALINA E., SQUARTINI A., ORGAMBIDE G., HUBBELL D.H. et DAZZO F.B. 2001 - Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharides degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can. J. Microbiol.* **47**:475-487.

MATHESIUS U., WEINMAN J.J., ROLFE B.G. et DJORDJOVIC M.A. 2000 - *Rhizobia* can induce nodules in white clover by "hijacking" mature cortical cells activated during lateral root development. *MPMI*. **13**:170-182.

MAY S.N. et BEN BOHLOOL B. 1983 - Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulation of lentils (*Lens esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:960-965.

MILLER K.J. et WOOD J. M. 1996 - Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:101-136.

MONTANEZ A. 2000 - Overview and Case studies on Biological Nitrogen Fixation: Perspectives and Limitations. In "**FAO Report 2000**". FAO, Rome, Italie. pp 1-11.

MOULIN L., MUNIVE A., DREYFUS B. et BOIVIN-MASSON C. 2001 - Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of *Proteobacteria*. *Nature* **411**:948-950.

## **N - O**

---

NAZIH N. et WEAVER R.W. 1994 - Number of rhizobia and delayed inoculation influence nodulation of clovers. *Plant Soil*. **158**:135-139.

NOUREDDINE N.E. 1998 - Production de polysaccharides extracellulaires chez quelques souches de *Rhizobium meliloti*: Propriétés biochimiques et rhéologiques, et effet de la salinité. Thèse de Magister. ISN-USTHB. 140 p.

NOVIKOVA N.I. 1994 - Numerical taxonomy of *Rhizobium* strains from legumes of the temperate zone. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:734-737.

ODEE D.W. 1993 - The Ecology of Nitrogen-fixing symbiosis under arid conditions of Kenya. PhD thesis, University of Dundee, Royaume-Uni. 145 p.

OLDRYOD G.E., ENGSTROM E.M et LONG S.R. 2001 - Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell*. **13**:1835-1849.

## **P - Q**

---

PAFFETI D., SCOTTI C., GROCCHI S., FANCELLI S. et BAZZICALUPO M. 1996 - Genetic diversity of an italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl Environ. Microbiol.* **62**:2279-2285.

PARNISKE M. 2000 - Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease?. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **3**:320-328.

PATEL J.J. et GERSON J. 1974 - Formation and utilisation of carbon

reserves by *Rhizobium*. *Arch. Microbiol.* **101**:211-220.

PATTISON A.C. et SKINNER F.A. 1974 - Effects of antimicrobial substances on *Rhizobium* spp. and their use in selective media. *J. Appl. Bact.* **37**:239-250.

PERRET X., FREIBERG C., ROSENTHAL A., BROUGHTON W.J. et FELLAY R. 1999 - High resolution transcriptional analysis of the symbiotic Plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* **32**:415-425.

PERRET X., STAEHELIN C. et BROUGHTON W.J. 2000 - Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **64**:180-201.

PHILLIPS D.A. 1980 - Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**:29-49.

PIETERNEL V.R. et VANDERLEYDEN J. 1995 - The *Rhizobium* plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.

PIRT S.J. 1975 - **Principles of microbe and cell cultivation**. Blackwell scientific publisher, Oxford. 234 p.

POSTGATE J.R. 1982 - **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge University Press. 252 p.

POTTIER-LAPETITE G. 1979 - **Flore de la Tunisie : Angiospermes-Dicotylédones (Apétales-Dialypétales)**. Editions du MESRS et Ministère de l'agriculture de Tunisie - Tunis. pp. 290-426.

PUEPPKE S.G. et BROUGHTON W.J. 1999 - *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *MPMI.* **12**:293-318.

PULAWSKA J. MAES M.W.A. et SOBICZEWSKI P. 2000 - Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:238-244.

QUEZEL P., SANTA S. 1962 - **Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales** (Tome 1). CNRS, Paris, France. pp. 462-558.

## R

---

RAI R., NASAR S.K.T., SIGH S. et PRASAD J. 1985 - Interactions between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris*) genotypes under salt stress. *J. Agric. Sci.* **104**:199-206.

RAVEN J.A. et SPRENT J.I. 1989 - Phototrophy, diazotrophy and Paleoatmospheres: Biological Catalyst and the H, C, N and O cycles. *J. Geol. Sci.* **146**:161-170.

RIDGE W.R. 1992 - A model of Legume root hair growth and *Rhizobium* infection. *Symbiosis* **14**:359-373.

ROBERTSON L.D., SINGH K.B., ERSKINE M. et ABD-EL-MOMEIN A. 1996 - Useful genetic diversity in germplasm collections of food and forage legumes from West Asia and North Africa. *Germplasm Resources and Crop Evolution.* **43**:447-460.

## S

---

SALSAC L., DREVON J.J., ZENGBE M., CLEYET-MAREL J.C. et OBATON M. 1984 - Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physiol. Vég.* **22**:509-521.

- SATO C., SCHNOOR J.L. et MC DONALD D.B. 1986 - Characterization of effects of copper, cadmium and nickel on the growth of *Nitrosomonas europaea*. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**:403-416.
- SCHUBERT K.R. et BOLAND M.J. 1984 - The cellular and intracellular organization of the reactions of ureide biogenesis in nodules of tropical legumes. Dans "**Advances in nitrogen fixation research**" Veeger C. et Newton W.E. (Eds.). Martinus Nijhoff Publisher Wageningen, Pays-Bas. pp. 445-451.
- SCHULTZE M. et KONDOROSI A. 1998 - Regulation of symbiotic root development. *Annu. Rev. Genet.* **32**:33-57.
- SEGUIN P., GRAHAM P.H., SCHEAFFER C.C., EHLKE N.J. et RUSSELL M.P. 2001 - Genetic diversity of Rhizobia nodulating *Trifolium ambiguum* in North America. *Can. J. Microbiol.* **47**:81-85.
- SMART J. 1990 - **Grain Legumes: Evolution and genetic resources**. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 200 p.
- SMIBERT R. M. et KRIEG N. R. 1984 - General characterization dans "**Manual of methods for general bacteriology**", Gerhardt P. (Ed.), American Society of Microbiology, Washington, USA. pp. 409-443.
- SMITH E., WOLTERS A. et ELSAS J.D. 1998 - Self-transmissible mercury Resistance plasmids with Gene-Mobilizing Capacity in Soil bacterial populations: Influence of Wheat Roots and mercury addition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1210-1219.
- SNEATH P.H.A. et SOKAL R.R. 1973 - **The principles and Practice of Numerical Classification: Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco, USA. 246 pages.
- SNEATH P.H.A. 1974 - The history and future potential of numerical concepts in systematics: the contributions of H.G. Gyllenberg. *Binary-Computing in Microbiology.* **7**:32-36.
- SNEATH P.H.A. 1995 - Thirty Years of Numerical Taxonomy. *Syst. Biol.* **44(3)**: 281-298.
- SOMASEGARAN P. et HOBHEN H.J. 1994 - **Handbook for Rhizobia**. Springer verlag, Berlin. 324 p.
- SPAINK H.P. 2000 - Root nodulation and infection factors produced by rhizobial Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:257-88.
- SPRENT J.I. 1994- Evolution and Diversity in the Legume-Rhizobium Symbiosis: Chaos theory?. *Plant. Soil.* **161**:1-10.
- SPRENT J.I. 2001 - **Nodulation in Legumes**. Royal Botanic Gardens, Kew. 221 p.
- STAM H., STONTHAMER A.H. et Van VERSEVELD H.K. 1987 - Hydrogen metabolism and energy costs of Nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:73-95.
- STERITT R.M. et LESTER J.N. 1980 - Interaction of heavy metal with bacteria. *Sci. Total. Environ.* **14**:5-17.
- STEWART W.D.P., FITZGERALD G.P. et BURRIS R.H. 1967 - *In situ* studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**:2071-2078.
- STOWERS M.D. 1985 - Carbon utilization by *Rhizobium*. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:89-108.

STREETER J. G. 1980 - Carbohydrates in soybean. II: Distribution of compounds in seedling during the onset of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* **66**:471-476.

STREETER J.G. 1991 - Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Adv. Bot. Res.* **18**:129-187.

STREETER J.G. 1993 - Translocation, A key factor limiting the efficiency of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plantarum.* **87**:616-623.

SUN J.S., SANDS R. et SIMPSON R. J. 1992 - Genotypic variation in growth and nodulation by seedling of Acacia species. *Forest. Ecol. Manag.* **55**:209-223.

SY A., GIRAUD E., JOURAND P., GARCIA N., WILLEMS A., De LAJUDIE P., PRIN Y., NEYRA M., GILLIS M. BOIVIN-MASSON C. et DREYFUS B. 2001 - Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* **183**:214-220.

## T

---

TAGUETT F. 1998 - Diversité des souches de *Rhizobium meliloti* des sols d'Algérie: Aspects physiologique et génétiques. Thèse de Magister. ISN-USTHB. Alger. 158pages.

TAKAHASHI T. 1993 - Induction of nitrogenase and hydrogenase activities in the free-living state of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Agr.* **27**:3-19.

TAYLOR N.L. 1985 - Clovers around the world. *Clover. Sci. Tech. Agron.* **25**:1-6.

TAYLOR N.L. 1990 - the true Clovers. Dans "**Advances in New crops**". Janick J., Simon J.E. (Eds.). Timber Press, Portland, USA. 221 p.

TRIPLETT E.C. et SADOWSKI M.J. 1992 - Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:399-428.

## U - V

---

VANCE C.P. 1983 - *Rhizobium* infection and nodulation: A beneficial plant disease? *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:399-424.

VANCE C.P. et GRAHAM P.H. 1995 - Nitrogen fixation in agriculture: Research priorities. Dans "**Nitrogen fixation: fundamentals and applications**". Tikhonovich I.A., Provorov N.A., Romanov V.I. et Newton W.E., (Eds.). Kluwer Academic Press. Dordrecht. Pp 77-86.

VANDAMME 1996 - Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.

VAN DE SANDE K. et BISSELING T. 1997 - Signalling in symbiotic root nodule formation. *Essays in biochemistry.* **32**:127-142.

VAN SPRONSEN P.C., BAKHUIZEN R., VAN BRUSSEL A.A.N. et KIJN J.W. 1994 - Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**:88-94.

VASSE J.D., De BILLY F. et TRUCHET G. 1993 - Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant. J.* **4**:555-566.

VELAZQUEZ E., IGUAL J.M., WILLEMS A., FERNANDEZ M.P., MUNOZ E.,

MATEOS P.F., ABRIL A., TORO N., NORMAND P., CERVANTES E., GILLIS M. et MARTINEZ-MOLINA E. 2001 - *Mezorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in Chico Arido region. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1011-1021.

VERMA D.S., MIO G.H., JOSHI C.P.C. et DELAUNEY C.A. 1991 - Internalization of *Rhizobium* by plant-cells : Targeting and role of peribacteroid Membrane nodulins. Dans "**Plant molecular biology 2**", Herman R.G. et Larkins B. (Eds.), Plenum Press, New York. pp. 121-197.

VINCENT J.M. 1970 - **A manual for the practical study of the root nodule bacteria**. IBP handbook n°15. Blackwell Sci. Publ. Oxford. 164 p.

VINCENT J.M. 1977 - *Rhizobium*. Dans "**A Treatise on dinitrogen fixation**" Hardy R.W.F. et SILVER W.S. (Eds.). Willey, New York. pp. 277-366.

VINCENT J.M. 1981 - Genus *Rhizobium*. In "**The prokaryotes**" STARR M.P., STOLP H., BALOWS A. et SCHLEGEL H.G. (Eds.) Springer, Verlag, Berlin. pp. 97-128.

VIPREY V., PERRET X. et BROUGHTON W.J. 2000- Host-Plant Invasion by Rhizobia. *Subcell. Biochemi.* **33**: 437-456. Dans "**Bacterial Invasion into Eucaryotic Cells**". Oelschlaeger A. et Hacker D.E. (Eds.). Kluwer Academic & Plenum Publishers. New York. pp. 213-285.

VITOUSEK P.M., ABER J.D., HOWARTH R.W., LIKENS G.E., MATSON P.A., SCHINDLER D.W., SCHLESINGER W.H. et TILMAN G.D. 1997 - Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appli.* **7**:737-750.

## **W - X - Y - Z**

---

WEAVER R.W., WEI G.R. et BERYHILL D.L. 1990 - Stability of plasmids in *R. phaseoli* during culture. *Soil. Biol. Biochem.* **22**:465-469.

WEAVER R.W. et WRIGHT S.F. 1987 - Variability in Effectiveness of Rhizobia during culture and nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:2972-2974.

WATERER J.G., VESSEY J.K., RAPER C.D. 1992 - Stimulation of nodulation in field peas (*Pisum sativum*) by low concentration of ammonium in hydroponic culture. *Plant. Physiol.* **86**:215-220.

YANCEY P.H. 1994 - Compatible and contracting solutes. Dans "**Cellular and molecular physiology of cell volume regulation**". STRANGE.K (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 81-109.

YAP S.F. et LIM S.T. 1983 - Response of *Rhizobium* sp. UMKL20 to sodium chloride stress. *Arch. Microbiol.* **135**:224-228.

YOUNG J.M., KUYKENDALL L.D., MARTINEZ-ROMERO E., KERR A. et SAWADA H. 2001 - A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1949 as new combinations: *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Inter. J. Syst. Evol.* **51**:89-103.

ZAHNAN H. H.1999 - *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under several conditions and in arid climate. *Rev. Microbiol. Mol. Biol.* **63**: 968-989.

ZAKHIA F. et De LAJUDIE P. 2001 - Taxonomy of Rhizobia. *Agronomie* **21**:569-576.

ZEVENHUIZEN L.P.T.M. 1987 - Production of exopolysaccharides by fast-growing Rhizobia and Agrobacteria. Dans "**Recent development in industrial polysaccharides**". Stivala S.S., Crescenzi V. et Dea I.C.M. (Eds.). Springer Verlag, New York. pp 45-68.

ZEVENHUIZEN L.P.T.M.1990 - Recent development in *Rhizobium* polysaccharides. Dans "**Novel biodegradable microbial polymers**". DAWES.E.A (Eds). Kluwers Academic Publishers, Amsterdam. pp. 387-402.

ZEZE A., MUTCH L.A. et YOUNG J.P. 2001 - direct amplification of NodD from Community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ. Microbiol.* **3**:363-370.

# Annexe

---

---

## Annexe 1

---

Composition du milieu minéral de Fahraeus

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	150mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	100mg
CaCl <sub>2</sub> .....	100mg
MgSo <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> o.....	120mg
Fer citrate.....	5ml
Sol d'oligo-élément	1ml

Composition de la solution d'oligo-élément.

H3Bo4.....	2,86g
MnSO4.....	2,08g
ZnSO4-7H2O.....	0,22g
CuSO4-5H2O.....	0,08g
NaMoO4.....	0,11g
Eau distillée.....	1000ml

Le pH du milieu est ajusté à 6,5 avec le HCl ou NaOH N/10 et stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20minutes.

Ce milieu dépourvu de toute sorte d'azote permet de placer les légumineuses dans des conditions propices à la nodulation.

## Annexe 2

---

Composition du milieu YEM

Mannitol.....	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSo <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> o.....	0,2g
Extrait de levure.....	0,4g
NaCl.....	0,1g
Eaudistillée.....	1000ml

Le pH du milieu est ajusté à 6,5 avec le HCl ou NaOH N/10 et stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20minutes.

Lorsque la version solide ou semi-solide de ce milieu est requise , nous ajoutons à la composition de base respectivement 12 et 15g d'Agar-Agar. Nous désignerons la version liquide par « mMilieu YEMB », les version solides par « YEMA », dans ce dernier cas le suffixe-CR (YEMA-CR) indiquera le milieu coloré par le rouge Congo.

#### **Composition du milieu de Cryo-conservation.**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3g
MgSo <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> o.....	0,01g
Sodium citrate trisodique.....	0,01g
Glycerol.....	25g
Eau distillée.....	1000ml

Ajuster à 6,5 avec le HCl ou NaOH N/10  
Stérilisation à 120° C pendant 20minutes.

## Annexe 3

---

### Dosage des protéines cellulaires

La croissance qui peut être assimilée à l'évolution de la biomasse protéique cellulaire a été évaluée sur nos souches par la mesure de la teneur en protéines des culots cellulaires obtenus après centrifugation des cultures à 7000g pendant 20mn. La technique de dosage des protéines retenue est celle préconisée par Bradford (1976).

#### Principe:

La méthode de Bradford (1976) est basée sur l'utilisation du bleu de Coomassie G250 qui renferme les deux formes de ce colorant: la forme bleue et la forme rouge. Cette dernière est convertie en forme bleue lorsqu'elle se fixe aux protéines. Cette conversion s'accompagne par une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel dans le jaune (couleur complémentaire du bleu).

Le complexe bleu de Coomassie-Protéines à un haut coefficient d'extinction molaire, responsable de la grande sensibilité de cette technique.

La fixation du Bleu de Coomassie aux protéines est un processus très rapide puisqu'elle s'achève en 2-3 minutes. Le complexe Bleu de Coomassie-Protéines reste dispersé dans le mélange réactionnel pendant environ 1 heure.

#### Mode opératoire

##### Traitement des échantillons

- des aliquotes de cultures sont centrifugées à 7000g pendant 20mn pour sédimenter les cellules
- à 0,2ml d'échantillon (culot cellulaire), ajouter un volume égal de NaOH 2N
- vortexer longuement pour remettre le culot en suspension.
- Porter le mélange au bain-marie à 100C pendant 30mn

##### Dosage

- A 0,1ml d'échantillon pur où dilué, ajouter 1ml de réactif au Bleu de Coomassie G250 agiter par vortex où retournement
- laisser reposer 3 minutes
- Lire l'absorbance à 595nm.

##### Réactif au bleu de Coomassie

- 10mg de Bleu de Coomassie G250
- 10ml d'acide phosphorique à 85%
- 90 ml d'eau

La teneur des culots cellulaires en protéines est déterminée par comparaison avec une droite de corrélation  $DO_{595nm} = f(\text{albumine bovine})$ . Les résultats obtenus avec cette méthode de dosage sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de protéines/ml de milieu ( $\mu\text{g}$  protéines/ml).

---

## Annexe 4

---

### Dosage des sucres totaux à l'anthrone sulfurique

#### Principe

L'acide sulfurique présent dans le réactif à l'anthrone provoque à chaud l'hydrolyse des EPS en déshydratant les monosaccharides. Les pentoses sont alors transformés en furfurals et les hexoses en hydroxyméthyl-furfurals. Ces dérivés réagissent avec l'antranol, forme tautomère de l'anthrone, en donnant une coloration verdâtre d'autant plus intense que le milieu est riche en sucres (pentoses et hexoses).

#### Mode opératoire

- à 0,2ml de surnageant, on ajoute 1ml de réactif à l'anthrone (0,2% d'anthrone dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 75%).
- laisser reposer dans la glace pendant 5 mn
- porter au bain marie bouillant (100°C) pendant 10 mn
- refroidir à nouveau dans la glace
- lecture de la densité optique à 625nm

#### Expression des résultats

La teneur des surnageants de culture en sucres totaux est déterminée par comparaison avec une droite de corrélation DO à 625nm = f(glucose). Les résultats obtenus avec cette méthode de dosage sont exprimés en µg d'équivalents glucose par ml de milieu (µg/ég/glucose/ml). Nous conviendrons d'exprimer ces résultats directement en µg de sucres/ml afin de faciliter la lecture du présent mémoire.

#### Extraction des polysaccharides extracellulaires

Chez les *Rhizobium*, en particulier chez *Rhizobium meliloti*, les exopolysaccharides forment des structures radiales réparties à la surface de la cellule formant ainsi une gangue muqueuse où **slime** entourant plus ou moins régulièrement la cellule (Carlson 1982, Mutafschiev 1985). La séparation de ces exopolysaccharides (EPS) des corps cellulaires est facile. Il suffit d'une petite force de cisaillement pour détacher les fibres radiales formées par les exopolysaccharides à la surface des cellules. Ceci est obtenu dans notre cas par la centrifugation des cultures (7000g pendant 20mn). Les exopolysaccharides demeurent dans le surnageant, alors que les cellules sédimentent. Dans ces conditions, la quasi-totalité des polysaccharides extracellulaires se retrouve dans le surnageant. En effet, une remise en suspension des cellules et une nouvelle centrifugation ne libère pas une quantité résiduelle d'EPS consistante (Nouredine 1998).

## Annexe 5

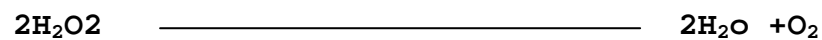
---

Tests biochimiques et physiologique.

### 1-Recherche de la catalase

- Principe

La catalase est une enzyme qui empêche l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dont l'action serait vitale pour la cellule bactérienne en catalysant la réaction :



l'oxygène libéré se dégrade sous forme gazeux (Marchal 1991).

- Mode opératoire

Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volume et y dissocier directement un fragment colonial prélevé sur le milieu solide dans des conditions stériles.

- Lecture
- 

La lecture est immédiate.

Si la souche examinée possède une catalase (+) : on observe un dégagement immédiat de bulle de gaz.

Si la souche examinée ne possède pas une catalase (-) : absence de bulles.

### 2- Test de mobilité

- Principe

Pour la détection de la mobilité de Rhizobium, nous avons utilisé le milieu YMA semi-solide contenant le rouge Congo.

## Annexe 6

---

Evaluation de la charge anionique (test au bleu alcian)(Ramus 1977)

- **Principe :**

Dans des tubesensemencés (culture de 3 jours) on ajoute une solution de bleu alcian, on le laisse agir 10min avant l'observation.

Le bleu alcian est un colorant cationique capable de former en milieu acide un complexe insoluble avec les groupements anioniques des exopolysacchrides.

La quantité de complexe EPS-bleu alcian formée est proportionnelle à la quantité des charges que présentent les EPS.

- **Technique :**

On fait agir 1 ml de bleu alcian avec la surface des colonies de telle sorte à immergé toute la surface de la culture.

- **Lecture :**

- Formation des agrégats importants (complexe EPS-bleu alcian) : souches produisent des EPS fortement anionique.
- Formation de petit complexes :souches produisent de EPS faiblement anionique.





