





# Table des matières

Remerciements . .	1
Résumé .	3
Summary . .	5
صغملها .	7
Liste des abréviations .	9
INTRODUCTION .	11
I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE . .	13
I.1. TAXONOMIE DES RHIZOBIUM . .	14
I.1.1. Ancienne classification des Rhizobium . .	14
I.1.2. Les nouvelles bases de la classification .	15
I.1.3. Introduction de nouveaux genres de Rhizobium . .	15
I.1.4. Le genre <i>Mesorhizobium</i> et position taxonomique du <i>Mesorhizobium ciceri</i> .	16
I.1.5. Evolution de la taxonomie des Rhizobium . .	18
I.1.6. La classification des <i>Rhizobium</i> la plus récente . .	20
I.2. LA SYMBIOSE : RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE .	21
I.2.1. Interaction Rhizobium-Légumineuse .	21
II- MATERIEL ET METHODES .	29
II.1. Obtention des isolats . .	29
II.1.2. Lieux de prélèvement (Sols) . .	30
II.1.3. Isolement des souches . .	32
II-1.4. Milieux de culture .	32
II.2. Tests d'authentification des isolats sur leur plante hôte . .	33
II.2.1. Stérilisation et germination des graines .	33
II.2.2. Stérilisation des substrats .	33
II.2.3. Inoculation et mise en culture .	33

<b>II.3. CARACTERISATION phénologique DES ISOLATS . .</b>	<b>34</b>
<b>II.3.1. Caractérisation morphologique et culturale . .</b>	<b>35</b>
<b>II.3.2. Caractérisation physiologique . .</b>	<b>36</b>
<b>II.4. CARACTERISATION SEROLOGIQUE . .</b>	<b>39</b>
<b>II.4.1. Obtention des immunosérums . .</b>	<b>39</b>
<b>II.4.2. Préparation des antigènes .</b>	<b>39</b>
<b>II.4.3. Protocole d'immunisation . .</b>	<b>40</b>
<b>II.4.4. Technique sérologique .</b>	<b>40</b>
<b>II.5. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE (nodulation et fixation d'azote) . .</b>	<b>41</b>
<b>II.5.1. L'activité réductrice d'acétylène .</b>	<b>42</b>
<b>II.5.2. Nombre de nodosités et leur poids frais . .</b>	<b>42</b>
<b>II.6. CARACTERISATION MOLECULAIRE . .</b>	<b>42</b>
<b>II.6.1. Amplification du gène par PCR (Polymerase Chain Reaction) .</b>	<b>43</b>
<b>II.6.2. Condition d'amplification .</b>	<b>43</b>
<b>II.6.3. Digestion enzymatique des amplifias d'ADN (PCR-RFLP) .</b>	<b>44</b>
<b>II.7. ETUDE STATISTIQUE .</b>	<b>44</b>
<b>II.7.1. Analyse numérique .</b>	<b>44</b>
<b>II.7.2. Analyse de la variance .</b>	<b>45</b>
<b>III- RESULTATS ET DISCUSSION .</b>	<b>47</b>
<b>III.1. Lieux de prélèvement (Sols) .</b>	<b>47</b>
<b>III.1.1. Texture des sols .</b>	<b>47</b>
<b>III.1.2. PH des sols .</b>	<b>47</b>
<b>III.1.3. Conductivité électrique des sols . .</b>	<b>48</b>
<b>III.2. Tests d'authentification des isolats .</b>	<b>48</b>
<b>III.3. CARACTERISATION phénologique DES ISOLATS .</b>	<b>48</b>
<b>III.3.1. Les caractères morphologiques .</b>	<b>49</b>
<b>III.3.2. Caractères cultureux .</b>	<b>52</b>
<b>III.3.3. Caractérisation physiologique .</b>	<b>54</b>
<b>III.3.4. Utilisation de différentes sources de carbone .</b>	<b>59</b>

III.3.5. Résistance aux antibiotiques .	64
III.3.6. Résistance aux métaux lourds .	65
III.3.7. Analyse numérique . .	66
III.3.8. Discussion . .	67
III.4. CARACTERISATION SEROLOGIQUE .	68
III.4.1. Spécificité et titre des immunosérums . .	68
III.4.2. Test ELISA . .	69
III.4.3. Discussion .	70
III.5. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE . .	72
III.5.1. L'Activité réductrice d'acétylène . .	72
III.5.2. Nombre et poids frais des nodosités .	73
III.5.3. Discussion . .	75
III.6. CARACTERISATION MOLECULAIRE .	75
III.6.1. Amplification du gène par PCR (Polymerase Chain Reaction) .	75
III.6.2. Digestion enzymatique des amplifias d'ADN (PCR-RFLP) .	76
III.6.3. Analyse numérique . .	77
III.6.4. Discussion . .	78
CONCLUSION .	81
Références bibliographiques .	85
Annexes . .	95
Annexe 1 : Milieux utilisés. .	95
Annexe 2 : Tampon utilisés. .	97
Annexe 3 : Caractéristiques du matériel végétal utilisé .	98
Annexe 4 : Résultats des différentes caractérisations. . .	98
Annexe 5 : Analyse de la variance. . .	102



## Remerciements

Travailler sur le Rhizobium n'a pas été une chose facile; ce travail n'aurait pas vu le jour sans la coopération active de plusieurs personnes. Je tiens à présenter mes sincères remerciements à :

Monsieur Ounane S. M. maître de conférence à l'Institut National Agronomique d'El-Harrach, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour ces conseils judicieux durant sa réalisation.

Monsieur BELLAL M.M. professeur à l'Institut National Agronomique d'El-Harrach, pour avoir accepté de présider ce Jury.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur BOUZNAD Z., professeur à l'Institut National Agronomique d'El-Harrach, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Monsieur SABAOU N. professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, pour ses conseils et discussions enrichissantes au cours de la réalisation de ce travail et pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Je tiens à remercier Melle BaCHA F. pour son soutien, son aide et discussions dont la caractérisation des Rhizobium nous a réunis et m'a fait gagner une amie.

Je tiens à remercier Monsieur Nesme X. professeur ingénieur au laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Claude Bernard LyonI, de m'avoir accepté dans le laboratoire et de m'avoir aidé à obtenir les souches références.

Je remercie profondément Mme Benhassine-hamadouche T. d'avoir accepté de faire la caractérisation moléculaire dans son laboratoire de Biologie Moléculaire à l'Institut Pasteur d'Alger, pour ses conseils, ses discussions enrichissantes et son amabilité. Mes remerciements également pour Monsieur Hamadouche, Samira, Karima et Hadjira pour leur aide et leur accueil chaleureux.

J'associe à mes remerciements Ahmed et Redouane pour leur aide pendant l'élevage, l'entretien et la saignée des lapins. Sans oublier Saïd du Département de la Post Graduation et Mohamed du Département de Botanique.

A Mademoiselle Abdelaoui K. pour son aide pour la partie sérologie, Kadri N., Benslimane H., Mohammed-Mahmoud F., AOULI S. Nouar S. et Kadi F. pour leur aide et soutien.

Je ne saurais comment remercier toute ma famille et mon Mari que j'ai impliqué dans ce travail.

Enfin, un grand merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail et que cette page ne suffira pas pour les citer tous.



## Résumé

L'étude de vingt deux (22) isolats de *Rhizobium* prélevés de nodules de pois chiche de plusieurs régions d'Algérie et de trois (03) souches de références, a été réalisée sur la base de leur comportement, dans le cadre d'une analyse de la diversité chez cette espèce.

Nous avons utilisé les approches phénologique, sérologique, moléculaire et symbiotique pour la caractérisation de ces isolats. A partir des différents tests utilisés, une grande diversité de comportement des isolats du *Rhizobium* du pois chiche a été observée. Cependant, aucune différence n'est apparue de part leur origine géographique.

Seuls les aspects symbiotiques et moléculaires nous ont permis de mettre en évidence des isolats intéressants (fixation d'azote atmosphérique et diversité génotypique intraspécifique).

Mots clés : *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, pois chiche, caractérisation, isolats, phénologie, sérologie, fixation d'azote, PCR-RFLP, *nodC*.



## Summary

The study of twenty two(22) strains of *Rhizobium* taken from chickpea nodules in several areas of Algeria and three (03) types strains was carried out on the basis of their behavior,coming within the framework of this specie diversity analysis.

We used the phenologic, serologic, molecular and symbiotic approaches to characterize these strains. From different tests, a great behavior diversity of chickpea *Rhizobium* strains has been observed. However, there was no difference concerning their geographical origin.

Only symbiotic and molecular aspects enabled us to highlight interesting strains (atmospheric fixing of nitrogen and intraspecific genotypic diversity).

Key words: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, chickpea, characterization, strains, phenology, serology, fixing of nitrogen, PCR-RFLP, *nodC*.



## ص خ ل م ا

##### # ##### (22) ##### ##### ##### ## ##### ##### ##### ## ### ##### ## ##### #  
### ## (03) #####, ## ##### ## ##### ##### ##### ##### ##### ##### ## ## #####

##### ## #####, ##### ##### #####, #####, ##### ## ## ##,  
##### ##### # ##### ##### ##### ##### ##### ## ## ##.

##### ## ##### ##### ## ## ##, ##### ## ##### ## ##### ## ## ##, # ## ##  
##### ## ##### # ##### ##### ##### ##### ## ## ## ##### ##### #####  
##### ##### ##### ##### ##### ## ## ## ##### # ##### #####  
#### ## ##.

##### #: #####, #####, ##### ## ##, ##### ## ##.



## Liste des abréviations

Code des souches 1<sup>ers</sup> chiffres : numéros de la wilaya.

2<sup>èmes</sup> chiffres : l'année du prélèvement de la nodosité.

3<sup>èmes</sup> lettres : lettre correspondant au nom de la localité.

NGR234 New Guinea Rhizobium

Sym Symbiotique

min Minute

A.R.A Activité Réductrice Acétylène

DO Densité Optique

pb Paire de base

µl Microlitre

ADNr16S ADN ribosomique 16S

dNTP déoxyNucléotide TriPhosphate

EDTA Ethylene Diamine TétraAcétate

TBE Tris Borate EDTA

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism

ds/m Siemens par mètre

EPS Exopolysaccharides

IGS Intergenic spacer

P Piégeage

Ref souche référence

ATCC American type culture collection

CP Chickpea

INRA Institut National de la Recherche Agronomique

ITGC Institut Technique des Grandes Cultures

nm Nanomètre

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

CE Conductivité électrique



# INTRODUCTION

Le pois chiche est une plante légumineuse protéagineuse qui occupe le deuxième rang des légumineuses les plus cultivées en Algérie. On le retrouve principalement à l'Ouest du pays, dans les wilayas de Ain Temouchent, Tlemcen, Mascara, Chlef, Mostaganem, Sidi Bel Abbas et Ain Defla, ainsi qu'à l'Est au niveau de Skikda et Guelma.

Cependant, il existe un écart important entre le rendement potentiel des variétés de pois chiche cultivées et le rendement au champ, ces dernières sont représentées par les Flip et les ILC introduites de l'ICARDA. En effet, le rendement national moyen est de 5.9 qx/ha et les surfaces cultivées restent faibles 23348 ha (2005) et ne permettent d'assurer qu'une faible partie de la consommation locale (Anonyme, 2005).

Le développement de cette culture passe obligatoirement par l'amélioration des rendements dont les facteurs limitants sont essentiellement les pratiques culturales peu adaptées, les adventices, les dégâts causés par divers pathogènes et ravageurs, la sensibilité des cultivars aux contraintes abiotiques telles que le déficit hydrique et l'insuffisance de fixation biologique de l'azote.

Pour atteindre cet objectif plusieurs voies sont envisageable, notamment l'amélioration de la symbiose pois chiche-*Rhizobium* en vue d'une optimisation de la nutrition azotée. Mais cette association ne peut fonctionner correctement que si les deux partenaires sont pris en charge simultanément. En effet, la présence dans le sol de souches de *Rhizobium* efficaces ou l'apport de souches sélectionnées pour leur performances (compétitivité, efficacité de la fixation) et leur adaptation à l'environnement, peut former une symbiose avec des variétés de pois chiche adaptées à nos conditions,

pouvant se traduire par une amélioration des rendements.

Le besoin de sélectionner des souches compétitives et plus efficaces a été souvent ressenti dans le cas du pois chiche (Rupela et Beck, 1990). Des augmentations spectaculaires de la production ont été réalisées dans les sols où les rhizobies indigènes manquent ou ne sont pas performants (Rupela et Saxena, 1987). Dans ce cas l'inoculation peut devenir nécessaire pour installer ou réinstaller des souches plus efficaces afin de maintenir une bonne symbiose capable de fixer le maximum d'azote.

La recherche de ces souches doit se faire d'abord au niveau du patrimoine autochtone, qui renferme une grande diversité. Néanmoins, l'identification, la caractérisation et l'étude des *Rhizobium* associés à la légumineuse d'intérêt écologique ou agronomique réel ou potentiel est un préalable indispensable à toute utilisation de ces bactéries symbiotiques.

En Algérie, excepté les travaux sur les effets des stress sur la fixation d'azote chez le pois chiche (Bacha, 2002; Ounane, 2004), il n'y a pas eu d'études sur les souches de *Rhizobium* nodulant le pois chiche. Toutefois, les études sur la diversité des *Rhizobium* nodulant le pois chiche ont montré que ces souches forment un groupe très spécifique et indépendant (Jarvis *et al.*, 1997), caractérisé par une grande hétérogénéité sur le plan physiologique et génétique et comprenant des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente. Seule la caractérisation polyphasique a permis d'identifier le *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum* et *Mesorhizobium* sp. pour les souches qui ont montré des caractères différents (Nour *et al.*, 1994a; Nour *et al.*, 1994; Nour *et al.*, 1995).

Actuellement, le développement des travaux sur la biodiversité des écosystèmes, a comme motif la compréhension de l'évolution et l'adaptation des populations naturelles en fonction des autres organismes en compétition, tout en tenant compte des facteurs environnementaux. En effet, la compréhension du fonctionnement de la symbiose nécessite l'acquisition de connaissances sur l'écologie des *Rhizobium*. Il est important d'estimer la diversité des populations naturelles, en caractérisant les isolats à partir des nodosités, mais aussi d'identifier les individus les plus efficaces et les mieux adaptés aux conditions environnementales.

Les objectifs de notre étude sont :

- Etudier la diversité des isolats du point de vue phénotypique (temps de génération, tolérance aux températures extrêmes; à la salinité; au pH; aux antibiotiques; aux métaux lourds ainsi que la dégradation des sucres), sérologique, fonctionnels et génétique.
- Voir si des groupements se forment entre les isolats appartenant à différentes régions par rapport aux caractères étudiés.
- Sélectionner des isolats intéressants par rapport à la fixation d'azote et leur tolérance aux conditions du milieu pour une éventuelle inoculation des sols Algériens.

## I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'association symbiotique des légumineuses avec les bactéries du sol, appelée communément les Rhizobium, mène à la formation de nodosités sur les racines et tiges des légumineuses, une structure organisée dans laquelle le microsymbiote est capable de fixer l'azote atmosphérique.

Les bactéries symbiotiques sont entièrement dépendantes, pour leur respiration et la fixation de l'azote, de l'approvisionnement en photosynthétas des plantes hôtes.

La famille des *Rhizobiaceae* présente un groupe de micro-organismes génétiquement divers et physiologiquement hétérogène, mais sont néanmoins classifiés ensemble, en vertu de leur capacité à noduler un groupe de plantes de la famille des légumineuses (Somasegaran et Hoben, 1985). Ce sont de petites cellules en forme de bâtonnets mobiles, Gram négatif, qui appartiennent à la subdivision  $\alpha$  de la sous classe des protéobactéries (Young *et al.*, 1996). À l'intérieur des nodosités, elles prennent des formes variées et caractéristiques; sous la forme bactéroïdes, elles sont capables de réduire l'azote moléculaire en azote combiné (ammonium) utilisable par la plante.

Vu l'importance de ces bactéries, le nombre d'isolats étudié n'a cessé d'augmenter. Ainsi, l'observation de la diversité des caractères chez cette famille et la classification des *Rhizobium* a suscité des remaniements continuels et ce, depuis l'isolement du premier rhizobium en 1888 par Beijerinck (in Sahgal et Johri, 2003).

## I.1. TAXONOMIE DES RHIZOBIUM

La taxonomie des *Rhizobium* a changé et de nouvelles espèces ont été décrites. Actuellement, la classification des *Rhizobium* se fait, non pas à partir de la plante hôte, mais sur des bases plus représentatives (Amarger *et al.* 1994).

### I.1.1. Ancienne classification des Rhizobium

---

Une spécificité d'hôte pour la formation des nodosités (inféctivité) et la fixation d'azote (efficacité) a été mise en évidence depuis très longtemps. Aucune souche de *Rhizobium* n'est capable de noduler toutes les légumineuses, mais chacune peut noduler quelques légumineuses et pas d'autres. Cela a conduit à la constitution de "groupes d'inoculation croisée" selon les légumineuses nodulées.

Ces résultats ont mis en évidence six groupes de *Rhizobium* basés sur le groupe d'inoculation croisé et leurs espèces correspondantes: *Rhizobium leguminosarum* (souche capable de noduler le *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens*) ; *Rhizobium trifolii* (*Trifolium*) ; *Rhizobium phaseoli* (*Phaseolus*) ; *Rhizobium meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*) ; *Rhizobium lupini* (*lupinus*) et *Rhizobium japonicum* (*Glycine max*). Les souches non classées étaient désignées par *Rhizobium sp.*

De nouveaux isolats ont été étudiés; des données se sont graduellement accumulées pour une nouvelle classification qui n'était pas uniquement basée sur la gamme d'hôte. Jordan, en 1982, a tracé la différence entre le *Rhizobium* à croissance rapide et le *Rhizobium* à croissance lente et a proposé le transfert de *Rhizobium japonicum* et *Rhizobium lupiniae* au nouveau genre *Bradyrhizobium*.

Dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Jordan, en 1984, a proposé une nouvelle classification des espèces de *Rhizobium*. L'analyse des résultats de plusieurs études, l'acquisition de données physiologiques (vitesse de croissance sur milieu YMA et variation de pH), la sérologie et la biologie moléculaire (contenu en G+C, hybridation ADN/ADN, ADN/ARNr), ont permis de subdiviser le seul genre *Rhizobium* en deux genres ; *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, respectivement pour les bactéries à croissance rapide et lente.

Ainsi, des légumineuses de groupes d'inoculation différents pouvaient être nodulées par des *Rhizobium* génotypiquement très proches (Jordan, 1984) et qu'une même légumineuse pouvait être nodulée par des *Rhizobium* génotypiquement distants (Scholla et Elkan, 1984).

La famille des *Rhizobiaceae* a regroupé, pendant longtemps, les *Rhizobium*, *Agrobacterium* et *Phyllobacterium* en se basant, principalement, sur la fonction caractéristique et commune ; induction de prolifération cellulaire sur les plantes (Jordan, 1984; Zakhia et de Lajudie, 2001).

### I.1.2. Les nouvelles bases de la classification

---

Du fait de nouveaux isollements, la taxonomie basée sur le concept de groupes d'inoculation a échoué à cause des nombreuses exceptions rencontrées. Les limites de cette dernière ont conduit les scientifiques à rechercher d'autres approches afin de classer ces bactéries.

En 1987, les taxonomistes ont proposé une définition phylogénétique des espèces bactériennes. Elle est basée sur des méthodologies variables, incluant l'étude de l'hybridation ADN/ADN et l'exploitation de la région d'ADN codant le 16S ribosomal.

La séquence d'ADNr 16S est une molécule très ancienne et hautement conservée chez les eubactéries (Woese, 1987). L'analyse génétique de cette région permet de réaliser des déductions phylogénétiques à partir d'analyse comparative de séquences de gènes des espèces bactériennes.

Depuis, la détermination des rapports génétiques entre les espèces bactériennes est établie simplement à partir d'une analyse comparative des séquences d'ADNr 16S. La conservation de l'ARN ribosomal, et l'existence de la variabilité dans quelques régions du fragment, rendent les séquences ribosomales des gènes d'ARN (5S, 16S, et 23S) très indiquées pour comparer les microorganismes et déduire des phylogénies (woeses, 1987). En fonction de la technique sélectionnée, cette caractérisation peut se faire à des niveaux taxonomiques, genre, espèce ou biovar, ou à des niveaux inférieurs pouvant probablement aller jusqu'au génome singulier (Amarger *et al.*, 1994).

La classification des *Rhizobium*, sans avoir recours à la plante hôte ni à d'autres propriétés phénotypiques, est possible. Elle est largement réorganisée avec la nomination de nouvelles espèces, incluant un panel de caractéristiques génétiques, phénotypiques et phylogénétiques.

### I.1.3. Introduction de nouveaux genres de *Rhizobium*

---

La taxonomie rhizobiale ne reflète pas globalement les caractéristiques symbiotiques des rhizobia, en particulier leur gamme de plantes hôtes. Une telle classification exige une standardisation des essais de nodulation et le contrôle optimal des conditions de croissance des plantes (Laguerre *et al.*, 2001)

Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses sont représentées par six genres appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Elles comprennent également les deux autres genres : *Agrobacterium* et *Phyllobactérium*.

Le nombre élevé de bactéries isolées des nodules de légumineuses, l'introduction de différentes méthodes basées sur la PCR, le séquençage des gènes codant le 16S amplifié par PCR et analysé par RFLP, ont été à la base de la nouvelle classification des *Rhizobium*. La caractérisation des souches de *Rhizobium* utilisant la nodulation comme seule propriété a été délaissée. Laguerre *et al.* (1994) ont prouvé que l'utilisation de la technique PCR-RFLP peut différencier des gènes de 16S d'ADNr, des souches de références de *Rhizobium* au niveau espèce et au niveau plus élevé.

---

Selon l'édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (1984), le genre *Rhizobium* représente les bactéries à croissance rapide. Elles ont une composition en pourcentage de G+C comprise entre 59 et 64% et acidifient le milieu de culture. Leurs gènes symbiotiques sont portés sur des plasmides.

Le genre *Bradyrhizobium* comprend les bactéries à croissance lente, possèdent un pourcentage en G+C compris entre 62 et 65% et alcalinisent le milieu de culture. Leurs gènes symbiotiques sont chromosomiques.

Le genre **Rhizobium**, défini par Jordan (1982), a subi une réorganisation par l'apparition du genre *Sinorhizobium* pour les isolats à croissance rapide, formant des nodules sur les racines de soja cultivé en Chine (Chen *et al.*, 1988). Ce genre a été redéfini plus tard par de Lajudie *et al.* (1994) en transférant *Rhizobium fredii* et *Rhizobium meliloti* au nouveau genre *Sinorhizobium*. Les espèces appartenant à ce dernier étaient rattachées avec le genre *Rhizobium* par l'analyse comparative des séquences d'ADNr 16S, mais ont été séparées par l'homologie ADN/ADN. Depuis, il y a eu l'addition de plusieurs nouveaux noms d'espèces dans ce genre, par exemple, *Sinorhizobium saheli* et *Sinorhizobium teranga*, isolées de différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* (de Lajudie *et al.* 1994) et *Sinorhizobium medicae* (Rome *et al.* 1996). Les genres *Rhizobium* et *Sinorhizobium* sont phylogénétiquement liés l'un à l'autre et se joignent avec les plantes hôtes.

Un quatrième genre *Azorhizobium*, avec *Azorhizobium caulinodans*, a ensuite été décrit par Dreyfus *et al.* (1988), pour des souches nodulant les tiges de *Sesbania rostrata* et a été redéfini par de Lajudie *et al.* (1994). Rinaudo *et al.* (1991), ont isolé *Azorhizobium* sp. sur la même espèce végétale, elle présente un faible pourcentage d'homologie ADN/ADN avec *Azorhizobium caulinodans*, mais présente les mêmes caractéristiques culturelles et génétiques.

Le cinquième genre, *Mesorhizobium*, a été nommé par Jarvis *et al.* en 1997, il regroupe les espèces phylogénétiquement proches de *Rhizobium loti*.

Le sixième genre, est représenté par *Allorhizobium undicola*, proposé par de Lajudie *et al.* (1998) pour le groupe de bactéries isolées de nodules de tige de la légumineuse tropicale des régions du Sénégal, *Neptunia natans*. La taxonomie polyphasique a démontré que ce groupe est séparé des cinq autres genres cités précédemment et qu'il était phylogénétiquement plus proche sur la base du 16S d'*Agrobacterium vitis* (de Lajudie *et al.*, 1998)

#### **I.1.4. Le genre *Mesorhizobium* et position taxonomique du *Mesorhizobium ciceri***

---

Au cours de nombreuses caractérisations des *Rhizobium*, on a distingué un groupe de spécificité étroite, formé par des bactéries qui montrent des caractéristiques les positionnant soit dans le genre *Rhizobium* soit dans le genre *Bradyrhizobium*. Le terme *Mesorhizobium*, proposé par Jarvis *et al.* (1997), a été utilisé pour décrire la position intermédiaire du groupe *Rhizobium loti* entre le complexe *Agrobacterium-Rhizobium-Sinorhizobium* et les genres *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium*.

---

Les *Rhizobium* à croissance rapide nodulant les racines de Lotus, étaient phylogénétiquement proches des *Rhizobium* obtenus à partir des espèces de plantes appartenant aux genres *Lupinus*, *Lotus*, *Anthyllis*, *Caragena*, *Astragalus*, *Onosi*, *Genisia* et *Mimosa*. Par ailleurs, les *Rhizobium* obtenus à partir de *Cicer arietinum* et de *Leucaena leucocephala* ont été longtemps rattachés aux espèces de *Rhizobium loti*.

Les souches de *Rhizobium* infectant le pois chiche ont été incluses dans des études de taxonomies sur les *Rhizobiaceae*, ces dernières ont abouti à des conclusions contradictoires. D'une part, plusieurs auteurs ont conclu que ces souches forment un groupe unique sur la base de la spécificité des rapports plante hôte-*Rhizobium* (Gaur et Sen, 1979), des caractéristiques sérologiques et antigéniques (Kingsley et Bohlool, 1983) et des traits culturels, d'autre part, Jarvis *et al.* en 1982, ont proposé que les souches infectant le pois chiche soient classées avec *Rhizobium loti* ou avec *Bradyrhizobium* sp. (*Cicer arietinum* L.), selon leur temps de génération.

Les *Rhizobium* qui nodulent le pois chiche sont très spécifiques et ne montrent pas d'affinité d'inoculation croisée avec tous les autres *Rhizobium* (Gaur et Sen, 1979; Rupela et Saxena, 1987), cette spécificité de plante hôte a été confirmée par Nour *et al.* (1994b). Ajouté à la spécificité prononcée, ils montrent une diversité pour les caractéristiques de croissance (Bromfield *et al.*, 1983; Nour *et al.*, 1994a).

Le travail de Nour *et al.* (1994a), sur plusieurs souches de collection isolées de pois chiche d'origine géographique diverse, a permis de décrire, en utilisant les standards retracés par Graham *et al.* (1991), plus particulièrement les homologies ADN/ADN, le séquençage de l'ADNr 16S, le polymorphisme de l'ADN16S-IGS ainsi que des tests phénotypiques : les espèces *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium* sp. appartenant au même genre (Nour *et al.*, 1994; Nour *et al.*, 1995). Les espèces *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* et *Rhizobium* sp. ont été reclassées dans le genre *Mesorhizobium* en 1997 (Jarvis *et al.*, 1997). D'autres études sont venues appuyer cette classification : Sullivan *et al.* en 1996, ont identifié des isolats de *Mesorhizobium* qui avaient des séquences identiques, ou très semblables du 16S ARN mais l'hybridation d'ADN a, par contre, montré que ces espèces sont différentes. Ainsi que le travail de Tighe *et al.* (2000) par la caractérisation des acides gras cellulaires de plus de 600 souches de *Rhizobium*, appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium* en utilisant la chromatographie en phase gazeuse basée sur le système microbien d'identification de Sherlock.

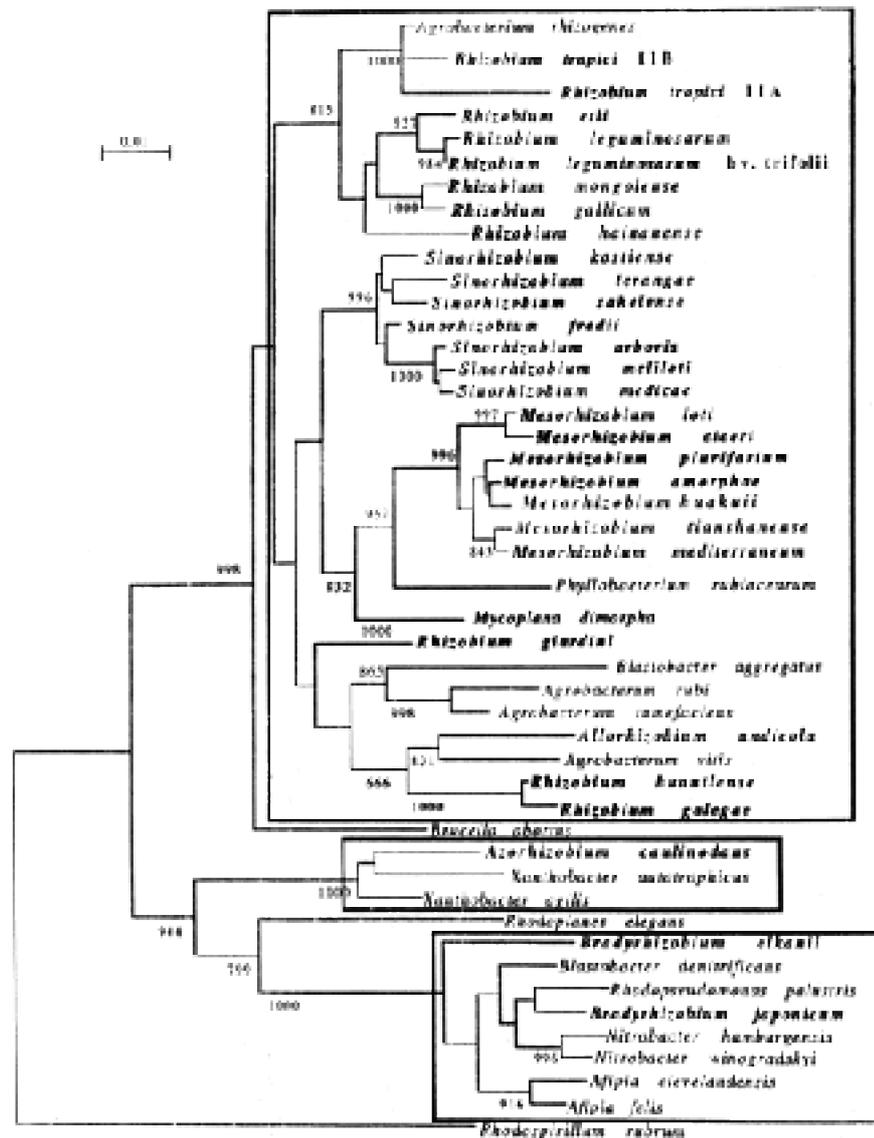


Figure 1 : Rapport phylogénétique basé sur la séquence 16S ARNr. Les espèces rhizobiales nodulant les légumineuses sont présentées en gras (Zakhia et de Lajudie, 2001).

### I.1.5. Evolution de la taxonomie des *Rhizobium*

La présentation des différences de séquences des ADNr 16S en distances phylogénétiques n'est pas restée sans polémique. L'utilisation de la variation de séquence de gène 16S ARNr à des fins taxonomiques, présuppose que l'évolution du génome progresse à un taux constant et que les gènes sont hérités d'une façon strictement hiérarchique (Broughton, 2003). Cependant, les *Rhizobium* ne présentent pas un groupe homogène depuis que celui-ci est mélangé avec des bactéries non symbiotiques (Young et al., 1996). Ils présentent des mécanismes pour le transfert de gènes qui pourraient, potentiellement, brouiller les distinctions taxonomiques.

Plusieurs études ont été initiées afin d'évaluer d'autres marqueurs moléculaires et en

---

déduire des comparaisons. L'hybridation d'acide nucléique est considérée comme un moyen fiable pour établir les rapports entre les espèces bactériennes. Classiquement, les espèces génomiques des souches présentent une homologie d'ADN supérieure ou égale à 70% (Wayne *et al.*, 1987), alors que le niveau inférieur exact, dont les organismes sont considérées comme appartenant aux espèces différentes, change. Dans certains cas de *Rhizobium*, l'homologie de l'ADN total, révélée par l'hybridation ADN/ADN semble ne pas être en accord avec la phylogénie ribosomale de la séquence 16S ( **Martinez-Romero, 1996** ). L'utilisation des séquences ribosomales des gènes d'ARN (5S, 16S et 23S) a abouti à trois arbres phylogénétiques morphologiquement distincts, impossibles à combiner dans un arbre simple (Broughton, 2003).

Les gènes d'ARN sont censés être protégés contre le transfert horizontal, en raison de leur structure antique et fondamentale dans la cellule. Cependant, des résultats de travaux prouvent qu'une petite partie du gène 16S ARNr de *Bradyrhizobium elkanii* proviendrait de *Mesorhizobium* par transfert latéral (van Berkum *et al.*, 2003). Sullivan *et al.* (1996) rapportent le transfert des séquences d'ARNr 16S entre des espèces du *Mesorhizobium*. Par ailleurs, d'autres travaux sur des Actinomycètes (Yap *et al.*, 1999) rapportent le transfert horizontal d'un gène entier ARNr.

D'autres gènes ont été utilisés pour établir des phylogénies, comme le *nifH* (gène de fixation); une évolution concordante a été observée dans la comparaison des phylogénies basées sur des séquences de *nifH* et des séquences de 16S (Young, 1992). Récemment, l'analyse d'un grand nombre de séquences a conclu que, pour les rhizobia, la phylogénie de *nifH* n'est généralement pas conforme à la phylogénie du 16S, mais elle est largement semblable à celle du gène *nodA*. Ce résultat peut s'expliquer du fait que les gènes *nod* et *nif* sont souvent étroitement liés chez les *Rhizobium*. Ils peuvent être situés sur les éléments transmissibles tels que des plasmides dans beaucoup d'espèces de *Rhizobium* (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan et Ronson, 1998; Haukka *et al.*, 1998).

L'utilisation des gènes codant la glutamate synthétase (*GSI* et *GSII*), pour l'étude de la phylogénie des *Rhizobium*, a montré une bonne corrélation entre la phylogénie du 16S ARN et le *GSI*, mais pas pour le *GSII* (Turner et Young, 2000).

D'autres phylogénies ont été établies pour les gènes de nodulation communs *nodABC* et les gènes de régulation *nodD*. Les résultats ont montré qu'ils ne concordent pas avec la phylogénie du 16S et ne reflétaient pas la taxonomie courante des *Rhizobium* (Ueda *et al.*, 1999; Laguerre *et al.*, 2001). Par contre, la caractérisation et la classification phylogénétique des rhizobia basées sur les gènes de nodulation peuvent aider dans la description de nouveaux genres et espèces de *Rhizobium*.

L'emplacement des gènes de symbiose sur des " îles " ou des plasmides renforce l'idée que ces régions offrent des possibilités intéressantes pour le transfert horizontal. Il est à noter, au préalable, que chez les bactéries du genre *Rhizobium*, les fonctions symbiotiques sont, pour une grande part, codées au niveau du plasmide symbiotique (pSym) souvent conjugatif. Sullivan *et al.* (1996) ont observé le transfert de la capacité de former des nodosités efficaces chez *Lotus corniculatus* avec les espèces différentes de *Mesorhizobium* se trouvant dans le sol. Bien que les gènes symbiotiques des *Rhizobium* isolés de *Lotus* soient sur le chromosome, ils peuvent être transférés au

non symbiotique dans l'environnement du sol car ils sont installés sur une île symbiotique (Sullivan et al., 1998)

Ces résultats suggèrent que les transferts symbiotiques peuvent se produire entre des espèces différentes. Le transfert interspécifique a été cité pour l'espèce de *Rhizobium*; les mêmes génotypes symbiotiques ont été isolés chez *Rhizobium phaseolus* bv. *leguminosarum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium gallicum*, et *Rhizobium giardinii* (Amarger et al., 1997). Si les différentes espèces de *Rhizobium* à croissance rapide échangent les gènes symbiotiques à des fréquences détectables, d'autres gènes pourraient également être échangés. Dans ce cas, il faut s'interroger sur la fiabilité et l'utilité des désignations d'espèce (Zhang et al., 2000).

Pour une bonne classification, Turner et Young (2000) proposent une compréhension plus détaillée des rapports évolutionnaires et écologiques parmi les rhizobia, et ce, par l'analyse de plusieurs séquences de gène (autant que possible) afin d'établir des rapports qui accèdent aux différentes séquences d'ADN. Selon Laguerre et al. (2001), bien qu'il est largement convenu que les phylogénies, basées sur les gènes chromosomiques stables, sont nécessaires à l'établissement d'une taxonomie rhizobiale biologiquement significative, une définition appropriée d'une large gamme de plantes hôtes devrait considérer la diversité des gènes Symbiotiques plutôt que la diversité des espèces qui les portent. Cela devrait ainsi, donner un sens dans le fait d'inclure la caractérisation et la classification phylogénétique des gènes Symbiotiques dans les normes minimales pour la description du nouveau rhizobia, comme précédemment proposé pour les séquences de gène de 16S ARNr (Graham et al., 1991). Une telle classification devrait fournir une structure de base complémentaire pour notre compréhension de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Laguerre et al., 2001).

### **I.1.6. La classification des *Rhizobium* la plus récente**

---

Les *Rhizobium* font partie de la sous classe  $\alpha$  des Proteobactéries, contenant les genres *Allorhizobium* (genre modifié de *Rhizobium*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, et *Sinorhizobium*. Ces derniers, constituent une branche rhizobiale, tandis qu' *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Methylobacterium* sont situés, chacun, sur une branche phylogénétique différente et bien distincte (Young et al., 2001).

Les symbiotes de légumineuses sont phylogénétiquement mélangés avec plusieurs autres genres de bactéries non symbiotiques (nitrifiantes et pathogènes). L'appellation *Rhizobium* se rapporte à toutes les bactéries capables de former des nodosités efficaces sur des légumineuses. Cependant, récemment, un nouveau groupe fixateur d'azote appartenant au groupe de *Methylobacterium* associant aux légumineuses (*Crotalaria* sp.) a été décrit (Sy et al., 2001), ainsi que la nodulation des légumineuses par *Buckholderia* sp., faisant partie de la sous classe  $\beta$  des protéobactéries (Moulin et al., 2001). Ces bactéries saprophytiques ou rhizosphériques sont devenues symbiotiques par l'acquisition de plasmide ou d'île symbiotique chromosomique (Sullivan et Ronson, 1998)

Une nouvelle classification est apparue sur le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2002), qui introduit respectivement les genres *Azorhizobium*,

---

*Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium* dans de nouvelles familles, *Azorhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae* et *Phyllobacteriaceae*. La famille *Rhizobiaceae* renferme deux genres ; *Rhizobium* et *Sinorhizobium*. Les espèces appelées auparavant *Allorhizobium* et *Agrobacterium* font partie du genre *Rhizobium* avec un nouveau changement de nom: *Rhizobium radiobacter* (pour *Agrobacterium radiobacter* et *Agrobacterium tumefaciens*), *Rhizobium rhizogenes* (pour *Agrobacterium rubi*), *Rhizobium undicola* (pour *Allorhizobium undicola*) et *Rhizobium vitis* (pour *Agrobacterium vitis*). Young *et al.* (2001), invoquent que le degré d'homologie étroit des séquences 16S ARN des espèces d'*Agrobacterium* et de *Rhizobium* justifie leurs regroupement dans un seul genre.

Dans la dernière classification qui date de 2006, la famille *Rhizobiaceae* regroupe le genre *Rhizobium* (incluant *Allorhizobium* renommé *Rhizobium undicola*), le genre *Mesorhizobium*, le genre *Ensifer* (*Sinorhizobium*), le genre *Bradyrhizobium*, le genre *Azorhizobium*, le genre *Agrobacterium* (renommé *Rhizobium*) ainsi que d'autres genres tels que *Methylobacterium*, *Burkholderia* et *Ralstonia* ([www.rhizobia.co.nz/taxonomy](http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy)).

La détermination des séquences d'ADNr 16S par la PCR et le clonage d'ADN de l'environnement du sol, ne peut donc fournir, à elle seule, une représentation exhaustive de la structure des communautés bactériennes mais permet une avancée importante dans notre compréhension de l'étendue de la diversité microbienne et des liens naturels qui peuvent être établis entre la biodiversité, l'écologie et l'évolution (Ward *et al.*, 1998)

## I.2. LA SYMBIOSE : RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE

### I.2.1. Interaction Rhizobium-Légumineuse

---

La symbiose Rhizobium-légumineuse est l'association la plus connue. Elle permet aux plantes appartenant à cette famille d'acquérir une voie supplémentaire de nutrition azotée : l'assimilation de l'azote atmosphérique, grâce à un complexe enzymatique appelé nitrogénase.

L'établissement d'une symbiose effective exige : (i) la colonisation et la survie des *Rhizobium* dans le sol, en état saprophytique et en compétition avec les autres microbes de la rhizosphère: cette phase est limitée par certains facteurs de l'environnement. (ii) une infection des racines et une compatibilité entre la plante hôte et la bactérie nodulatrice pour établir des nodules effectifs (Bordeleau *et al.*, 1994)

L'interaction symbiotique commence quand la bactérie colonise la surface des racines et induit leur déformation. Elle montre une grande spécificité de l'hôte, et seules certaines combinaisons plante-Rhizobium sont compatibles pour établir une symbiose fixatrice d'azote (Schultze et Kondorosi, 1998).

Les premiers signaux intervenant dans l'interaction symbiotique consistent en des composés sécrétés par les racines, appartenant à diverses sous-classes du groupe des flavonoïdes. La spécificité des interactions plante-rhizobium est en partie liée à la

diversité des flavonoïdes produits. La détection, par les bactéries, de tels composés dans les exsudats racinaires, va conduire à l'expression de toute une série de gènes, dits gènes de nodulation ou gènes *nod*. Ces gènes sont localisés sur un plasmide (plasmide pSym) pour les espèces de *Rhizobium* à croissance rapide et sur le chromosome bactérien, chez les espèces à croissance lente, telle que *Bradyrhizobium*. En réponse à la signalisation issue de la plante, les bactéries synthétisent et sécrètent des molécules signalées appelées les facteurs Nod (Long, 1989).

Les facteurs Nod induisent plusieurs réponses biochimiques, génétiques et morphologiques caractéristiques, une fois reconnus par la légumineuse, comme la déformation du cheveu racinaire, la division des cellules corticales et l'expression des gènes (Downie et al., 1999).

### **1.2.1.1. Spécificité**

Le rapport entre les *Rhizobium* et les légumineuses est sélectif. Les différentes espèces de *Rhizobium* ont une gamme distincte de plantes hôtes permettant la nodulation d'un ensemble particulier de légumineuses. La spécificité de l'interaction repose sur un dialogue moléculaire où sont impliqués des flavonoïdes libérés par la plante et les produits des gènes de nodulation (gènes *nod*) de la bactérie (Cleyet-Marel et al., 1996).

Les facteurs Nod et les flavonoïdes de la plante sont impliqués dans la détermination de la spécificité de la plante hôte. C'est une vraie communication entre les deux partenaires symbiotiques menant à l'identification de chacun (Schultze et Kondorosi, 1998).

Les gènes de nodulation bactériens (*nod*) qui sont induits par les flavonoïdes de la plante, déterminent la synthèse des facteurs Nod. C'est le principal signal moléculaire de nodulation, le type et la quantité des facteurs Nod sont importants dans la détermination de la spécificité de l'hôte (Perret et al., 2000).

Plusieurs travaux ont confirmé la relation étroite existant entre la structure des facteurs Nod et la spécificité d'hôte (Dénarié et al., 1996; Schultze et Kondorosi, 1998; Long, 2001). L'espèce de *Rhizobium* sp. souches NGR234 et *Rhizobium fredii* souche USDA257, forment respectivement des nodules efficaces sur 136 et 66 espèces de légumineuses (Pueppke et Broughton, 1999). Les deux souches produisent des facteurs Nod semblables sauf la USDA257 qui manque de quelques uns.

L'acquisition de la capacité d'être infecté par les rhizobia promiscuieux a apparemment été perdue chez cinq tribus comprenant les cicereae, les viciae et les trifoleae. Les microsymbiotes de ces plantes sécrètent généralement moins de facteurs Nod fortement modifiés; ce qui explique la gamme étroite de plantes hôtes, qui est une spécialisation, qui s'est développée, pour certaines plantes, dans des niches écologiques restreintes (Perret et al., 2000).

Le degré élevé de spécificité dans l'interaction de légumineuse/*Rhizobium* est conféré par la structure du facteur Nod et la nature du signal phénolique de la plante (Schultze et Kondorosi, 1998).

Des études ont montré que la taxonomie des *Rhizobium* qui dérive des études

moléculaires du ARNr ne concorde pas avec celle établie à partir du facteur Nod. Cette dernière correspond, plutôt, à la gamme d'hôtes indiquant qu'une plante donnée, définit la structure du facteur Nod pour le déclenchement des réponses de la symbiose (Dénarié *et al.*, 1996).

La caractérisation de plusieurs espèces de *Rhizobium* produisant des facteurs Nod montre une structure d'un squelette de base, constitué de quelques résidus N-acetyl-D-glucosamine (quatre à cinq) (Spaink *et al.*, 1992), portant trois types de substitutions (Figure 3) (i) un groupe sulfate sur le glucide réducteur, (ii) un groupe O-acetyl sur carbone 6 du glucide terminal non réducteur et (iii) un acide gras en C16 doublement insaturé en position 2 et 9, sur l'atome d'azote du sucre terminal non réducteur. Suivant la bactérie, ce squelette comporte des groupes chimiques variés (fucose, carbamate, méthyle, arabinose) présents sur les glucosamines situées aux deux extrémités. Des études portant sur plusieurs plantes hôtes ont démontré que les groupes latéraux fournissent la spécificité pour une plante donnée (Long, 2001).

### 1.2.1.2. Gènes impliqués dans l'établissement de la symbiose

#### 1. Gènes de régulation et facteurs Nod du microsymbiote :

Le premier signal pour l'interaction symbiotique émane de la plante par le biais des flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires. Ces derniers agissent sur les gènes de régulation, synthétisant ainsi les protéines NodD à l'intérieur de la membrane bactérienne qui serviront de détecteurs environnementaux et activateurs de transcription des facteurs Nod (Mulligan et Long, 1985). La transcription des signaux extracellulaires "les facteurs Nod" (Dénarié, 1996) agissent en tant que facteurs externes de croissance, déclenchent un programme endogène de nodulation de la plante hôte (Schultze et Kondorosi, 1998) (Figure 2)

Un certain nombre de gènes des *Rhizobium* contrôlant l'infection et la nodulation chez la plante hôte (les gènes *nod* ou *nol*), ont été identifiés et classés dans deux catégories : les gènes *nod* structuraux et les gènes *nod* de régulation (qui contrôlent l'expression des gènes *nod* structuraux).

Dans la première étape, les gènes *nod* de régulation sont impliqués dans la détection des signaux présents dans les exsudats racinaires de la plante. Ils activent les gènes *nod* structuraux, qui déterminent la production des signaux lipooligosaccharidiques extracellulaires: facteurs Nod (van Rhijn et Vanderleyden, 1995) qui, à leur tour, reviennent à la plante.

Les gènes *nod* sont organisés en plusieurs opérons, dont l'expression est régulée par la protéine NodD. L'interaction du NodD avec les flavonoïdes spécifiques de la plante hôte représente le premier niveau de l'identification de la spécificité de l'hôte (Schultze et Kondorosi, 1998 ; Long, 1999). De ce fait, le NodD agit comme une sonde de signal de la plante et comme régulateur transformationnel des gènes *nod*.

#### 2. Gènes de nodulation :

Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire et la connaissance de la génétique des *Rhizobium*, ces quinze dernières années, les gènes impliqués dans

les premières étapes de la nodulation (gènes *nod*) ont été identifiés (Long, 1989). Leur expression est nécessaire pour provoquer chez la plante l'apparition de phénotypes caractéristiques de la symbiose, comme la courbure des poils absorbants, l'induction de divisions répétées des cellules corticales de la racine, conduisant à la formation d'un organe totalement différencié : la nodosité (Lerouge *et al.*, 1990).

Chez les souches de *Rhizobium*, les gènes concernés par les premières étapes de la nodulation (gènes *nod*), la détermination de la gamme d'hôte et la capacité à fixer l'azote (*fix* et *nif*) sont regroupés dans un large plasmide « symbiotique » (*pSym*). Par contre, chez les souches de *Bradyrhizobium*, les gènes *nod* et *nif* sont plus dispersés que chez les souches de *Rhizobium* et sont localisés sur le chromosome bactérien (Johnston, 1989).

Les gènes de nodulation sont classés en deux catégories : Les gènes communs et les gènes de spécificité de l'hôte. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans la détermination de la gamme d'hôtes.

#### **A. Gènes communs :**

Les gènes *nodABC* sont appelés "gènes *communs* de nodulation" et sont présents chez tous les rhizobia. D'autres gènes, tels que *nodFE nodH nodSU* et *nodZ* sont présents dans diverses combinaisons chez des espèces rhizobiales. Ils sont appelés "gènes de nodulation de spécificité" (Dénarié *et al.*, 1996)

Les gènes communs de nodulation sont conservés et ont une fonction universelle chez tous les rhizobia. Les mutations de ces gènes suppriment l'interaction précoce avec la plante, le recourbement du cheveu racinaire et l'induction du nodule (Kondorosi, 1991).

Les enzymes Nod, intervenant dans la constitution du squelette de base du Nod facteur, sont codées par les gènes *nodABC*, tandis que les enzymes Nod intervenant dans la synthèse ou le transfert des groupes chimiques additionnels sont codées par les gènes *nod* dits spécifique (Freiberg *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). Il a, en effet, été montré que NodC, qui présente des homologies de séquence avec des chitines-synthases, possède une activité N-actyl-glucosaminyl-transférase, et pourrait donc catalyser la synthèse de la chaîne d'oligochitine (Spaink *et al.*, 1994). NodB contrôle la désacétylation du résidu N-acétyl-glucosamine de l'extrémité non réductrice de la molécule, le rendant ainsi disponible pour l'acylation.

Le transfert d'un acide gras sur l'atome d'azote ainsi libéré est sous le contrôle de NodA (Spaink, 1995). D'une manière plus simple, on peut dire que le NodC a un rôle dans la synthèse du squelette saccharidique et le NodA et B jouent un rôle dans la fixation de la chaîne aliphatique, au niveau de l'extrémité non réductrice du squelette (Schultze et Kondorosi, 1998; Wais *et al.*, 2002) (Figure 3)

Les gènes communs *nod* sont, dans une certaine mesure, également impliqués dans la détermination de la spécificité de la gamme d'hôtes et sont essentiels pour la formation des nodosités.

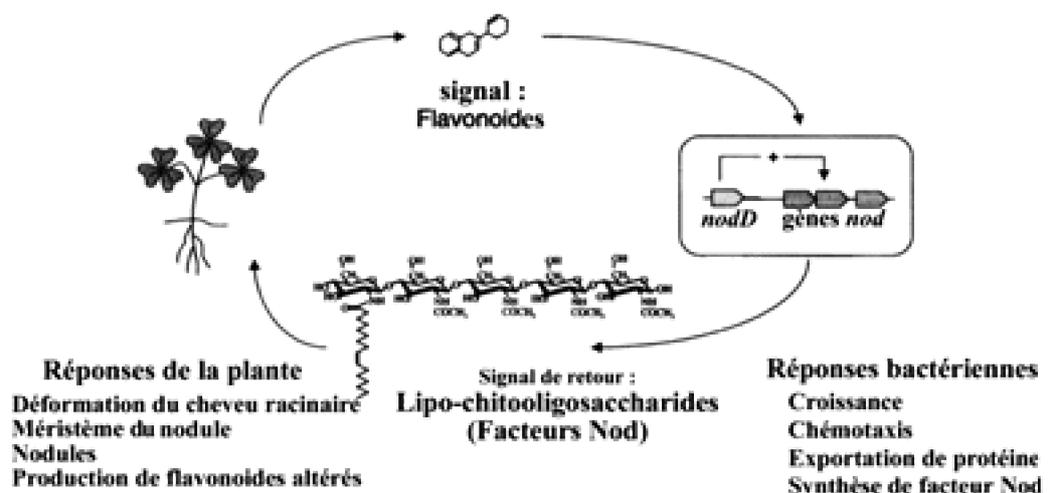
La phylogénie des gènes communs de nodulation des *Rhizobium* n'est pas corrélée avec la phylogénie du 16S, mais reflète la phylogénie des plantes hôtes (Dobert *et al.*, 1994; Lindström *et al.*, 1995).

### B . G ènes de spécificité :

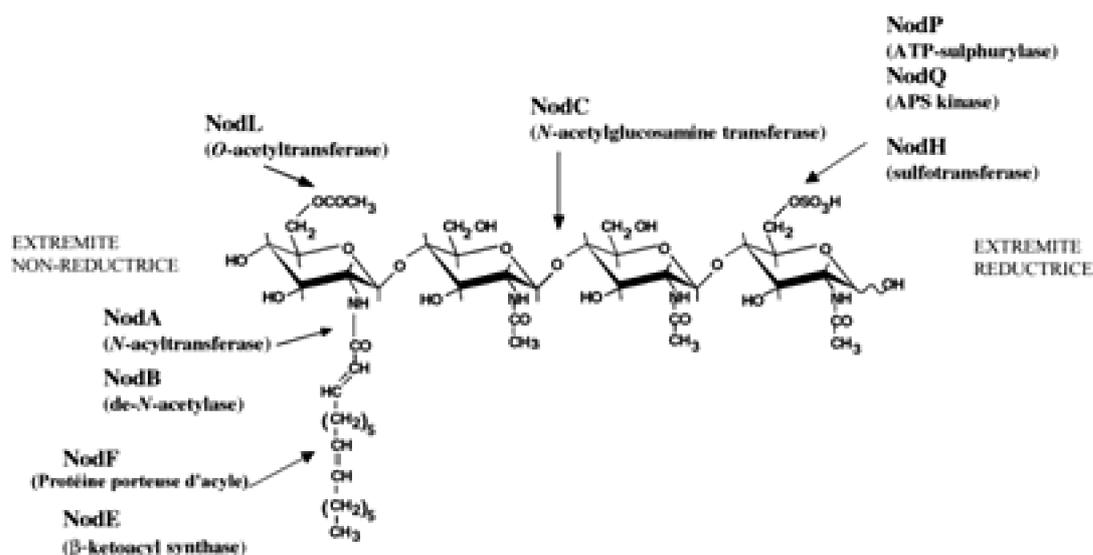
L'identification spécifique entre les micros et les macrosymbiotes est commandée par les gènes de nodulation spécifique *hsn* (host specific nodulation genes), bien que l'appellation de ces gènes soit généralement *nod* ou *nol*. La désignation originale des gènes de spécificité a été basée sur l'incapacité des mutants à être complétés par des gènes *nod* d'autres espèces de *Rhizobium* (Kondorosi, 1984). Les gènes *nod* spécifiques ont pour fonction d'assurer la synthèse ou le transfert des différents substituants qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité vis-à-vis de telle ou telle plante. Les gènes, tels que *nodFE*, *nodH*, *nodSU*, *nodG*, *nodH*, *nodL* et *nodZ* (Dénarié et al., 1996 ; Martinez-Romero, 1996 ) , sont présents dans diverses combinaisons chez les espèces rhizobiales, ce qui confère la diversité des facteurs Nod. Ces gènes, dans la majorité des cas, ne sont pas essentiels pour la nodulation (Kondorosi, 1984).

### 3. Gènes *nif* et gènes *fix* :

Les gènes *nif* codent pour la biosynthèse du complexe enzymatique nitrogénase (Earl et al., 1987). Les gènes *fix* ont un rôle dans la différenciation et le métabolisme des bactéroïdes. Ils assurent le transport du pouvoir réducteur nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase (Martinez et al., 1990).



**Figure 2 :** Echanges de signaux entre les partenaires impliqués dans la symbiose "rhizobium-légumineuse" pendant les premières étapes de la nodulation (Lindström et al., 2002)



**Figure 3 :** La structure du facteur de nodulation chez *Sinorhizobium meliloti*.

Chaque protéine Nod est codée par un gène équivalent appelé gène *nod* (Wais et al., 2002)

#### 4. Déterminants et gènes de la plante liés à la nodulation :

Les principaux types de molécules de polysaccharides semblent jouer un rôle important dans les étapes de nodulation. Les exopolysaccharides (EPS), qui sont faiblement attachés à la surface externe de la membrane cellulaire rhizobiale, et les lipopolysaccharides (LPS) qui contiennent les antigènes "O" somatiques jouent un rôle important dans les étapes précoces de la nodulation de la plante hôte. D'autre part, ils se sont avérés des déterminants importants pour la nodulation spécifique de la plante hôte et la compétitivité rhizobiale (Vlassak et Vanderleyden, 1997).

Beaucoup de gènes identifiés sur la base de leur expression induite pendant le développement des nodosités (gènes de nodulines) semblent coder des protéines des parois cellulaires. Les gènes de noduline sont définis comme des gènes de plante exclusivement induits dans les nodules de racine.

Les nodulines sont classifiées en nodulines précoces et nodulines tardives, selon le temps d'apparence de leur transcription, pendant le processus de développement de la nodosité.

Les exemples incluent des gènes codant les protéines riches en proline appelées nodulines précoces, qui s'expriment pendant les premières phases de la formation du nodule (Tajima et Kouchi, 1997). Des travaux ont montré que les marqueurs de facteurs Nod induits précocement sont l'*enod12* et les *rip1*, ils sont associés aux étapes de préinfection. L'*enod12* et les *rip1* peuvent opérer dans les modifications de parois cellulaires, observées dès l'infection des rhizobium ou par traitement de facteur Nod (Geuts et Bisseling, 2002).

Les autres gènes de la plante appelés nodulines tardives, sont induites après l'organogenèse du nodule, juste avant le début de la fixation d'azote, et sont considérés comme jouant un rôle essentiel dans la fixation symbiotique (Tajima et Kouchi, 1997).

### I.2.1.3. Processus d'infection

Le développement des nodosités a lieu en une série d'étapes, commandées par des gènes aussi bien de la bactérie que de la plante.

Les études sur la génétique moléculaire et la biologie de la cellule ont révélé plusieurs événements quelque peu indépendants :

(i) croissance du rhizobium dans la rhizosphère de la plante hôte; (ii) induction de gènes de nodulation des Rhizobium par l'exsudat de la plante; (iii) production du facteur Nod; (iv) attachement des rhizobium aux racines de la plante hôte; (v) induction de divisions cellulaires chez la plante; (vi) pénétration du Rhizobium dans la plante par l'intermédiaire du cordon d'infection; (vii) engouffrement du rhizobium dans le symbiosome intracellulaire (infection); (viii) initiation de la nodosité et recourbement du poil absorbant; (ix) développement du nodule permettant la fixation d'azote atmosphérique par les bactéroïdes (Lindström *et al.*, 2002; Hadri *et al.*, 1998).

Chez les légumineuses, la première étape du processus d'infection est la perception des métabolites de la plante (flavonoïdes) par les Rhizobium présents dans la rhizosphère. D'autres ensembles de signaux, nécessaires pour l'accomplissement du processus d'infection et l'organogenèse du nodule, sont les polysaccharides extracellulaires (EPS), les lipopolysaccharides, les antigènes, les glucanes et les léctines (Broughton *et al.*, 2000).

Quand le Rhizobium colonise la surface de la racine de la plante hôte, il induit des changements morphologiques de l'épiderme. Ces changements sont précédés par l'induction de certains gènes de nodulation précoce (enod12 et enod11) (Geurts et Bisseling, 2002).

Les facteurs Nod, sécrétés par les Rhizobium, activent un nombre d'étapes précoces chez la plante telles que les fluctuations de certains ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ), bien connus pour leur rôle physiologique et régulateur (Cardenas *et al.*, 2000).

Plus tard, en réponse aux facteurs Nod, les cheveux racinaires de la plante subissent une déformation provoquée par une réinitiation de la croissance des cellules terminales, mais dans une autre direction (Heidstra *et al.*, 1994), ce qui provoque leur recourbement. Ces changements morphologiques sont précédés par un changement du cytosquelette, à l'intérieur des cellules du cheveu racinaire (Cardenas *et al.*, 1998).

Durant le processus de courbure, la paroi des cellules de la plante est modifiée de façon très locale, menant à l'occlusion et à l'invasion de la bactérie. Le mode d'infection par le Rhizobium varie et dépend principalement de la plante hôte (Hadri *et al.*, 1998).

Les étapes qui suivent, sont la croissance du cordon d'infection contenant les cellules de Rhizobium vers le péricycle de la racine, se développant en primordium nodulaire, la ramification du cordon d'infection afin d'infecter un plus grand nombre de cellules du primordium et la libération des bactéries dans le cytoplasme des cellules végétales, la différenciation des bactéries en bactéroïdes, couplée avec la synthèse de la leghémoglobine et du complexe enzymatique nécessaire à la fixation de l'azote produit après (Broughton *et al.*, 1984); les nodosités efficaces sont caractérisées par la

présence de la région de la leghémoglobine à l'intérieur.

## II- MATERIEL ET METHODES

Depuis leur isolement et la découverte de leur intérêt agronomique, les rhizobia sont des bactéries de mieux en mieux connues. Ils ont fait l'objet de très nombreuses études et sont utilisés à grandes échelles, dans l'inoculation des semences de légumineuses.

De plus en plus de *Rhizobium* sont isolés et caractérisés, spécialement ceux des zones tropicales et méditerranéennes, où la diversité est peu étudiée. Cependant, le nombre d'espèces connues de rhizobia est probablement inférieur au nombre existant. D'ailleurs, la plupart des investigations ont été effectuées, surtout sur des légumineuses qui présentent une importance agricole, principalement les *Fabaceae*.

Actuellement, la diversité des rhizobia est évaluée par un choix de méthodes conçues pour recueillir des données qui sont produites des caractères phénotypiques et génotypes. Ceux-ci incluent : l'analyse phénotypique classique et taxonomie numérique, l'analyse entière de protéine de la cellule, l'analyse des acides gras cellulaires, la RFLP des gènes conservés qui inclut les gènes du 16S ARNr et l'espace intergénique et bien d'autres méthodes, pour une présentation maximale des souches caractérisées.

### II.1. Obtention des isolats

Notre étude a porté sur des isolats issus de nodules de pois chiche, conservés dans des tubes contenant un dessiccateur (Chlorure de Calcium  $\text{CaCl}_2$ ). D'autres nodules ont été

---

obtenus, par piégeage, en semant des graines de pois chiche sur des sols issus de différents sites prospectés (Figure)

Dans un premier temps, un isolement a été effectué en début d'expérimentation sur 68 échantillons de nodules représentant plusieurs régions. Après une purification des isolats obtenus, un test de nodulation sur sable stérile et une caractérisation moléculaire (au niveau du laboratoire d'écologie microbienne, à l'université de Claude Bernard- Lyon □) qui s'est révélée négative.

Un deuxième isolement a été effectué en utilisant des milieux sélectifs pour éliminer les contaminants, tels que les *Pseudomonas* et les *Agrobacterium*.

La liste des vingt deux isolats étudiés dans notre travail, ainsi que l'origine et les caractéristiques du sol, sont consignées dans le (Tableau 1).

Dans cette étude, trois souches références, provenant du laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Claude Bernard, Lyon □, ont été utilisées.

## **II.1.2. Lieux de prélèvement (Sols)**

---

Les échantillons de sols ont été prélevés sur des terrains où la culture de pois chiche était installée, néanmoins, les régions étudiées ne sont pas exclusivement utilisées pour cette culture (Figure 1). Pour les régions de l'Est, localités d'El-Harrouche, Aïn El Kebira, Tamlouka, Aïn Makhlouf, le pois chiche est cultivé en rotation avec les céréales. Quant à Oued Ghir (région Est), Tipaza et Lakhdaria, faisant partie dans cette étude de la région centre, le sol a été prélevé de parcelles de cultures traditionnelles. Les localités de Baraki et Oued Smar présentent des surfaces expérimentales de la culture du pois chiche appartenant respectivement à l'INRA et l'ITGC. Pour les zones de l'Ouest, les localités où les nodosités ont été prélevées représentent les zones potentielles de la culture du pois chiche en Algérie.

Code des Sources	Lieux de prélèvements du Sol (Localité)	Région	Propriétés du sol		
			pH	CE (1:2.5)	Texture
21-01-FH (g)	F-Homoucha	Est	8,25	1,00	Argilo- limoneuse
15-01-AP	Al-Filichha	Est	8,20	1,00	Limono-argileuse
21-01-TM	Tar-couka	Est	8,10	1,57	Limoneuse
21-01-AM	Al-Makrouf	Est	7,40	0,52	Limoneuse
06-12-01 (g)	Oued-El-H	Est	8,00	0,20	Argilo- limoneuse
02-02-TE (g)	Tanah	Centre	7,72	1,68	Argilo- limoneuse
10-02-1P (g)	Lakhdaria	Centre	8,10	0,15	Limono-argileuse
10-02-03 (g)	Oued-Sera	Centre	0,00	0,2	Limono-argileuse
10-01-LB	Darak	Centre	0,44	0,77	Argilo- limoneuse
16-01-AL	Al-E-Andja	Ouest	8,20	1,78	Limono-argileuse
16-01-AR	Al-E-Rha	Ouest	8,10	1,10	Argileuse
16-01-HB	Hamam-Eul-adjir	Ouest	8,15	2,29	Limoneuse
45-02-FA (g)	F-Aadh	Ouest	8,25	1,00	Limono-argileuse
46-01-AP1	Al-F-Rha	Ouest	8,00	1,10	Argilo- limoneuse
40-01-LYA	L-Yahia-Aissouf	Ouest	0,00	1,00	Limoneuse
40-01-LYU	J-Malah-Lenkerqui	Ouest	0,10	2,19	Limoneuse
10-01-LB	Jenish	Ouest	0,10	0,50	Limono-argileuse
15-12-01 (g)	Moucaoud	Ouest	8,30	0,58	Limoneuse
46-12-FH (g)	Ran-krouh	Ouest	8,03	0,37	Argilo- limoneuse
10-01-LN	Lennaya	Ouest	0,00	0,29	Limoneuse
14-01-SD	Selama	Ouest	0,50	1,19	Limono-argileuse
14-01-SA	Sihous	Ouest	0,00	0,22	Argileuse
<b>Sources</b>	<b>Espèce</b>	<b>Origine</b>			<b>Plante hôte</b>
A-001503 ref <sup>*</sup>	Mesorhizobium ciceri	Espagne (URPM-CAV)	-	-	Fois chiche
A-001503 ref <sup>*</sup>	Rhizobium sp	Inde	-	-	Fois chiche
CHU ref <sup>*</sup>	Rhizobium sp	Tunisie	-	-	Fois chiche

**Tableau 1** : Code des Isolats bactériens, lieux de prélèvements et caractéristiques des sols.

\* : Nour et al., 1995.

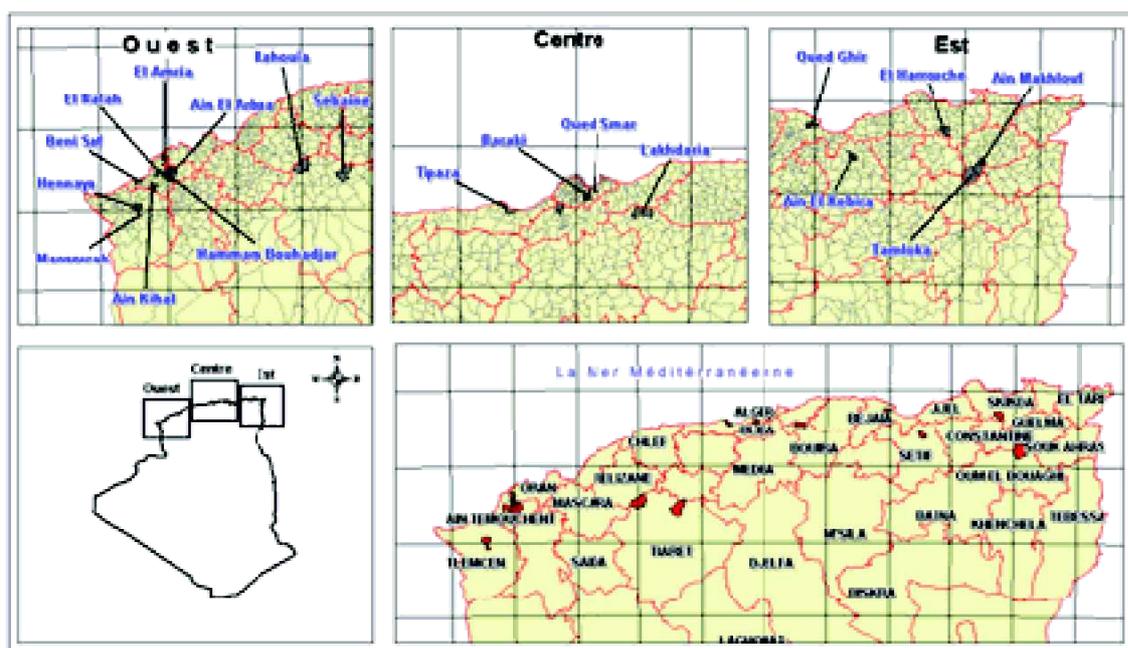


Figure 4 : Sites prospectés pour le prélèvement des nodules et des échantillons de sol

### II.1.3. Isolement des souches

L'isolement et la purification des souches ont été réalisés au laboratoire par les méthodes classiques de Vincent (1970). Les nodules secs sont hydratés avec de l'eau physiologique, désinfectés par immersion pendant 30 secondes dans une solution de chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) à 0,1%, puis rincés abondamment dans 03 baigns successifs d'eau distillée stérile, afin d'éliminer toute trace du  $\text{HgCl}_2$ .

La souche référence représentant *Mesorhizobium mediterraneum* n'a pas pu être obtenue.

Sous une hotte stérile, le nodule est écrasé dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau physiologique stérile; puis 100  $\mu\text{l}$  de cette suspension est étalée dans une boîte de Pétri, contenant du YMA (Tableau 2).

Après incubation à 28°C et apparition de colonies, une purification est effectuée par repiquages successifs de la culture bactérienne. Sur un isolement effectué à partir de 46 échantillons de nodules, seules les colonies de forme circulaire et mucôide, présentant un aspect homogène, ont été retenues pour le reste du travail.

La purification est suivie d'une coloration de Gram (Vincent, 1970) et les isolats Gram négatif sont repiqués en tubes sur milieu YMA incliné et incubés à 28°C. Après la croissance des colonies bactériennes, les isolats sont conservés à 4°C.

### II-1.4. Milieux de culture

Pour l'isolement, la purification, la culture et la caractérisation des souches, nous avons utilisé les milieux suivants : milieu YMA Rouge Congo, YMB (Annexe I).

## II.2. Tests d'authentification des isolats sur leur plante hôte

Faute de milieux de culture spécifiques pour les Rhizobia, le seul milieu sélectif reste la plante hôte elle-même. Cette contrainte nous a amené, après avoir isolé et purifié les colonies bactériennes en conditions d'asepsie, à inoculer la plante hôte (pois chiche) dans un milieu (substrat) stérile.

L'identification des isolats a été réalisée sur la variété de pois chiche ILC 3279, avec deux répétitions par souche et un témoin non inoculé pour s'assurer des conditions d'asepsie de la culture des plantes. Plusieurs milieux ont été testés : milieu Farhaeus semi-solide (Annexe I), milieu liquide (Annexe I), sol, sable de rivière, vermiculite et sciure de bois (Figure 5).

### II.2.1. Stérilisation et germination des graines

---

Les graines de pois chiche sont stérilisées en surface par un traitement au Chlorure de mercure à 0,1% pendant 1mn, puis rincées 5 fois à l'eau stérile. Après le dernier lavage, elles sont mises à imbiber dans l'eau physiologique stérile pendant 1 heure, puis mises à germer à l'obscurité dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (7 g/l) stérile à 25°C.

Trois jours après, lorsque les racines atteignent un centimètre, les graines germées sont transférées dans le milieu de culture ou le substrat.

### II.2.2. Stérilisation des substrats

---

Le sol, le sable de rivière, la vermiculite et la sciure de bois, sont stérilisés 3 fois par autoclavage pendant 20mn à 120°C, en laissant 24 heure entre chaque traitement. Les substrats sont, ensuite, mis dans des pots (65x95mm).

### II.2.3. Inoculation et mise en culture

---

L'inoculation est réalisée par un apport de 1ml d'inoculum contenant  $10^9$  cellules/ml en culture monoxénique. La suspension d'inoculation est obtenue par repiquage de la souche dans le milieu YMB, cultivée sous agitation à 28°C pendant 48 heures.

Cette méthode d'inoculation des graines, lors de la mise en culture, donne de meilleurs résultats en terme de nodulation (Kyei-Boahen et al., 2002).

Les graines germées sont mises en culture :

- dans des tubes (20x200mm) contenant 25 ml de milieu Farhaeus sur plan incliné, les

---

racines inoculées sont protégées de la lumière par un papier aluminium (Figure 5).

· dans des pots (65x95mm), contenant les différents substrats.

Les tubes et les pots sont transférés dans un phytotron à une température de 24°C avec une photopériode de 14 heures de jour et 10 heures de nuit.

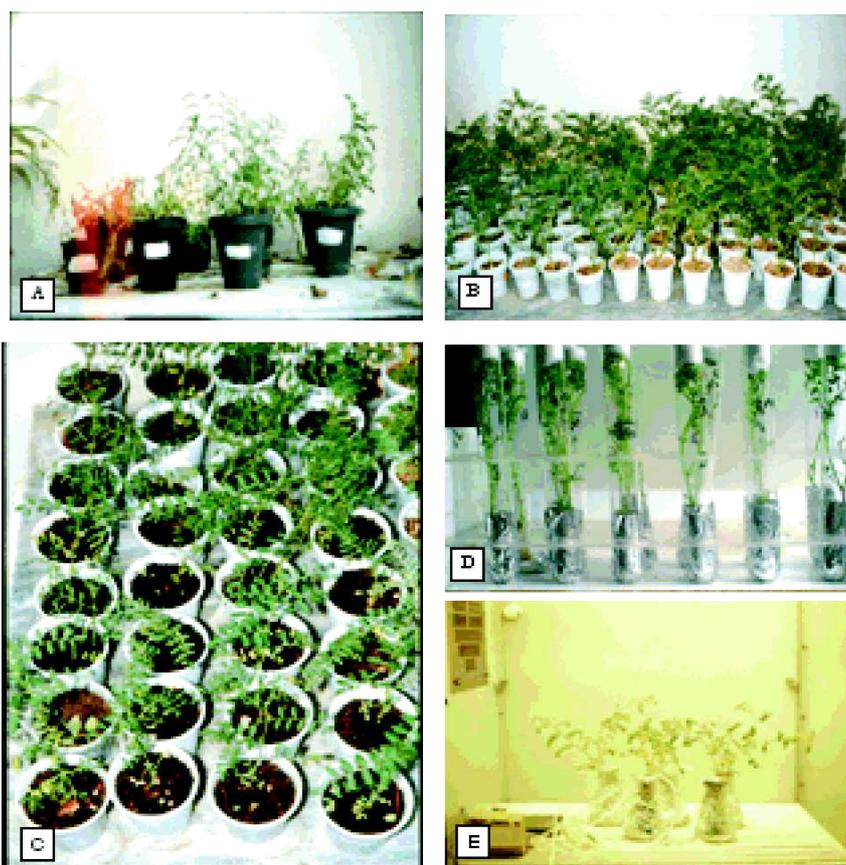
Les plants mis dans le sol et le sable de rivière sont arrosés quotidiennement avec de l'eau stérile. La vermiculite et la sciure de bois (support non nutritif) sont arrosées avec le milieu Farhaeus ne contenant pas de source d'azote.

## **II.3. CARACTERISATION phénologique DES ISOLATS**

Avant cette dernière décennie, les bactéries étaient caractérisées, groupées et identifiées selon quelques caractères phénotypiques tels que la morphologie, la pigmentation, la réaction aux colorants, la présence ou l'absence de spores, les conditions nutritionnels, la capacité de produire des acides à partir des sucres et la sensibilité aux inhibiteurs. Ces méthodes simplifiées de caractérisation restent toujours la base des systèmes de classification et d'identification (Biossis, 2000).

Néanmoins, l'augmentation du nombre d'isolements a conduit à l'apparition de nouvelles méthodes de caractérisation plus discriminantes.

Dans notre étude, nous avons déterminé les caractéristiques morphologiques, culturelles, physiologiques, biochimiques, sérologiques, moléculaires et symbiotiques des souches isolées.



**Figure 5 :** (A)Le Piégeage des souches de *Rhizobium* sur des sols de régions différentes.

(B), (C), (D), (E)Les substrats utilisés pour l'authentification : (B)vermiculite,(C) sciure de bois, (D) milieu gélosé,(E)milieu liquide.

### II.3.1. Caractérisation morphologique et culturale

Les caractères phénotypiques basés sur l'utilisation de substrat sont généralement employés dans des buts de taxonomie numérique, fournissant d'importantes informations écologiques lorsque les substrats utilisés se produisent dans l'habitat de l'organisme (Dupuy *et al.*, 1994).

#### II.3.1.1. Caractères morphologiques

Un inoculum est préparé sur milieu YMA et les caractéristiques morphologiques sont examinées après 48 heures de culture. Les principaux critères retenus sont : la taille des colonies (diamètre), la forme, la couleur, l'opacité, la production et texture d'EPS.

#### II.3.1.2. Les caractères culturaux

##### II.3.1.2.1. Mobilité sur mannitol

Le caractère recherché est la mobilité des bactéries, elle est évaluée en piquant le milieu

mannitol mobilité semi-solide en tube (Institut Pasteur Algérie) à l'aide d'une öse contenant une colonie de *Rhizobium* issue d'une culture jeune.

Les bactéries mobiles se déplacent dans la gélose molle (migration d'un trouble à l'intérieur du milieu) après incubation à 28°C.

### **II.3.1.2.3. Acidification du milieu de culture**

Les isolats sont cultivés dans des erlens de 250 ml contenant 100 ml de YMB (à pH 7). Après 5 jours d'incubation à 28°C, une mesure du pH du milieu de culture est effectuée.

## **II.3.2. Caractérisation physiologique**

---

Les différents facteurs considérés sont le pH, la salinité et la température. La croissance des bactéries est estimée visuellement après 7 jours d'incubation par rapport à un témoin sur YMA sans modification.

### **II.3.2.1. Temps de génération**

#### **a. Dénombrement des bactéries :**

Une série de dilutions, au dixième de la suspension d'isolats à dénombrer, est réalisée. 100 µl de chaque dilution est étalée dans une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu YMA, au nombre de trois répétitions pour chaque suspension. Au même moment, à partir de ces dilutions, une suspension d'1ml est prélevée pour les mesures d'absorbance à 620 nm pour la corrélérer ultérieurement avec le nombre de colonies obtenues sur boîte de Pétri.

Après 5 jours de croissance à l'obscurité et à 28°C, les colonies sont dénombrées et les concentrations de la suspension de *Rhizobium* est estimée par le nombre moyen de colonies obtenu par boîte, corrigé par le facteur de dilution et par le volume étalé (Somasegaran et Hoben, 1985).

#### **b. Calcul du temps de génération des bactéries :**

Une culture bactérienne est préparée dans des tubes à essai contenant 7 ml de milieu YMB, à partir d'un repiquage récent sur YMA, 100 µl de cette suspension est utilisée pour inoculer 50 ml du même milieu dans des erlens de 100 ml puis mis en agitation à 28°C.

Une lecture au spectrophotomètre, à 620 nm, de 1 ml de la précédente culture est faite toutes les 2 heures à partir du moment de l'inoculation (Monza *et al.*, 1992).

La pente de la courbe de croissance en logarithme népérien est égale à  $\ln 2 / T$  et qui représente le taux de croissance  $\mu$ .

Pendant la phase exponentielle, une courbe de croissance a l'équation suivante:  
$$DO_t = DO_o \cdot e^{\mu t}$$

Le taux de croissance des souches, en linéarisant l'équation par passage à la forme logarithmique devient :  $\ln DO_t = \ln DO_o + \mu t$ .

Le temps de génération de chaque isolat est calculé selon la formule :  $T = t \cdot \ln 2 / \ln \frac{DO_0}{DO_t}$ .

Ln : logarithme népérien.

T : Temps de génération.

t : Temps de croissance en heures.

$DO_t$  : Densité optique au temps t.

$DO_0$  : Densité optique au temps 0.

### II.3.2.2. Croissance sur milieu minimum

Les colonies bactériennes sont ensemencées sur milieu minimum, caractérisé par l'absence de source d'azote.

### II.3.2.3. Tolérance aux températures extrêmes

Les boîtes de Pétri contenant le milieu YMA sont ensemencées avec 100 µl d'une suspension bactérienne (contenant approximativement  $10^3$  bactéries/ml) et incubées à des températures de : 8, 15, 37 et 42°C avec un témoin à 28°C.

□□.3.2.4. Tolérance à l'acidité et à l'alcalinité du milieu :

L'aptitude des isolats de *Rhizobium* à se développer dans un milieu acide ou basique est testée, par repiquage de 100 µl d'une culture bactérienne, sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA à différents pH : 3.5, 5, 8 et 10 (le pH est ajusté par l'utilisation du HCl et NaOH)

### II.3.2.5. Tolérance à la salinité (NaCl)

La croissance bactérienne est estimée sur milieu YEM contenant différentes concentrations en NaCl : 0,25 ; 0,5 ; 1 et 1,5 g/100ml.

### II.3.2.6. Utilisation de différentes sources de carbone

Les bactéries sont cultivées sur milieu YMB pendant 3 jours, collectées par centrifugation à 8000 g à 4°C pendant 5 min, lavées 2 fois au PBS à pH 7,4 (Annexe II), puis resuspendues dans le milieu utilisé pour la dégradation des sucres (Irisarri *et al.*, 1996; Fulchieri *et al.*, 2001).

Des tubes remplis à 5 ml de milieu utilisé pour la dégradation des sucres liquide (Annexe I) contenant du Bleu de Bromothymol (25 µg/ml) et le substrat carboné approprié (5 mg/ml), stérilisé à l'aide de filtre (Millipore, 0,22 µm), sont inoculés avec 100 µl d'une suspension bactérienne, à raison de deux répétitions par sucre et par isolat, avec un témoin non inoculé.

Le bleu de bromothymol permet de contrôler visuellement l'évolution du pH pendant la croissance des bactéries.

Les sucres utilisés sont : des monosaccharides (D-arabinose, D-glucose, D-fructose,

D-galactose, mannose, rhamnose, ribose, sorbose, xylose), des disaccharides (cellobiose, lactose, maltose, tréhalose), un trisaccharide (raffinose), des polyols (glycérol, D-mannitol, sorbitol) et l'amidon.

La dégradation des sucres, par les bactéries, est révélée par un changement de couleur du milieu, provoqué par l'augmentation de l'acidité de celui-ci. La lecture des résultats se fait après 7 jours d'incubation.

### **II.3.2.7. Résistance aux antibiotiques**

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques permet de définir *in vitro*, l'antibiotique le plus actif sur une colonie bactérienne. Dans notre cas, nous avons utilisé la technique par diffusion.

A partir d'une préculture sur YMB, 500 µl d'une suspension bactérienne sont prélevées et étalées sur une boîte de Pétri contenant du YMA. Des disques d'antibiotiques sont déposés sur les boîtes ensemencées après dessèchement de celles-ci. Pour permettre la prédiffusion des antibiotiques, les boîtes sont laissées sous la température de la hotte pendant 10 minutes puis incubées à 28°C à l'obscurité.

L'appréciation de la sensibilité et résistance de chaque isolat est estimée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, autour du disque de l'antibiotique utilisé, et ce, après la croissance de l'isolat. Dans notre cas on a considéré l'isolat comme étant sensible lorsque le diamètre est supérieur ou égal à 20 mm. Il est résistant lorsqu'il y a absence de cette zone autour du disque d'antibiotique ou quand la zone d'inhibition est inférieure à 20 mm.

Les antibiotiques (SANOFI diagnostic pasteur) utilisés sont ; Acide nalidixique (30µg), Chloramphénicol (30µg), Erythromycine (15UI), Kanamycine (30UI), Polymyxine (300UI), Pénicilline (6µg), Spiramycine (100µg).

### **II.3.2.8. Résistance aux métaux lourds**

Certains éléments chimiques sont nécessaires à la production végétale jusqu'à un certain seuil : ce sont les oligo-éléments ; Fe, Zn, Cu, Mn, Br, Mo,...Au delà du seuil limite, ils deviennent phyto-toxiques. D'autres, issus en général d'effluents industriels (Cd, Pb, Hg, Ni...), sont toxiques pour le sol et les plantes. Les effets nuisibles des métaux lourds sur la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique par les *Rhizobium* ont été rapportés pour le trèfle (Rother *et al.*, 1983) et le pois chiche (Yadav et Shukla, 1983).

Sept métaux lourds ont été choisis pour cette étude, afin d'évaluer la résistance des bactéries à ces derniers. Une seule concentration a été choisie pour chaque élément. Cette concentration présente le maximum normal accepté par les normes AFNOR (U-44041) dans les sols (Anonyme, 1997). L'objectif est d'élargir la gamme des métaux et distinguer l'effet de chaque élément sur la croissance des isolats de cette collection.

Les solutions stocks de métaux sont stérilisées, par filtration avec une membrane millipore (0,2 µ) et additionnées au milieu gélosé stérile comme suit :

**Tableau 2 : Concentration des métaux utilisés**

---

Les éléments	Concentration, en ppm
Cd (CdSO <sub>4</sub> )	2,5
Co (CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O)	40
Zn (ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	300
Pb (Pb (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> )	100
Ni (NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O)	100
Cu (CuSO <sub>4</sub> )	100
Hg (HgCl <sub>2</sub> )	1

## II.4. CARACTERISATION SEROLOGIQUE

La sérologie est de nature à faciliter l'identification des microorganismes. Longtemps utilisée sur les *Rhizobium* (Vincent, 1970; Kingsley et Bohlool, 1983; Somasegaran et Hobben, 1985; Arzac et Cleyet-Marel, 1986), elle a servi dans un premier temps pour des besoins de taxonomie, puis pour l'étude des populations dans leur environnement.

Les techniques immunologiques sont basées sur l'utilisation de sérum produit par des animaux à sang chaud préalablement immunisés. Plusieurs techniques sérologiques peuvent être appliquées à l'étude de *Rhizobium*. Les principales techniques sont : l'agglutination, l'immunodiffusion, l'immunofluorescence et le test ELISA.

La méthode utilisée dans cette étude, est une technique immuno-enzymatique, précise et extrêmement sensible, qui est le test ELISA indirect.

Cette technique utilise un marqueur enzymatique pour visualiser une réaction antigène-anticorps. La réaction est révélée par l'emploi d'un substrat chromogène et la coloration obtenue est mesurée par spectrophotométrie.

### II.4.1. Obtention des immunsérums

Les immunsérums sont obtenus selon la méthode Monza *et al.* (1992). La réponse immunitaire est stimulée par une série d'injections sous cutanées chez des lapins femelles âgés d'un mois.

### II.4.2. Préparation des antigènes

Les cellules bactériennes portent à leur surface plusieurs structures antigéniques. L'application des techniques sérologiques, à l'étude de la constitution antigénique des bactéries, a permis de mettre en évidence des antigènes somatiques et des antigènes flagellaires thermostables.

Dans notre cas, la cellule entière est utilisée pour stimuler la réponse immunitaire. Il était impossible de produire des sérums pour chaque isolat. Nous nous sommes, donc,

limités à cinq isolats représentant les trois régions étudiées pour obtenir des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la bactérie considérée.

Chaque isolat est cultivé sur milieu YMB en agitation. Après 5 jours, la culture bactérienne est centrifugée à 8000 g pendant 20 min à 4°C et lavée 3 fois au PBS. Au dernier lavage, le culot est resuspendu dans de l'eau physiologique stérile (NaCl 9%) et ajusté afin d'obtenir des suspensions bactériennes denses ( $10^9$  cellules/ml). Ces dernières, sont réparties en petits flacons stériles (vol. 5 ml) à raison de 3 ml et conservés à 4°C.

### **II.4.3. Protocole d'immunisation**

---

Des injections sous cutanées des suspensions obtenues sont pratiquées en 5 sites différents, sur le dos de l'animal. Le premier jour, 1ml de la suspension est mélangé avec l'adjuvant de Freund incomplet (1 :1), dans le but d'améliorer la réponse immunitaire. Les lapins sont immunisés pendant 6 semaines avec 0.5 ml de la même suspension, sans l'adjuvant, avec une semaine d'intervalle entre chaque injection.



**Figure 6 :** Immunisation de lapin par injection des suspensions bactériennes.

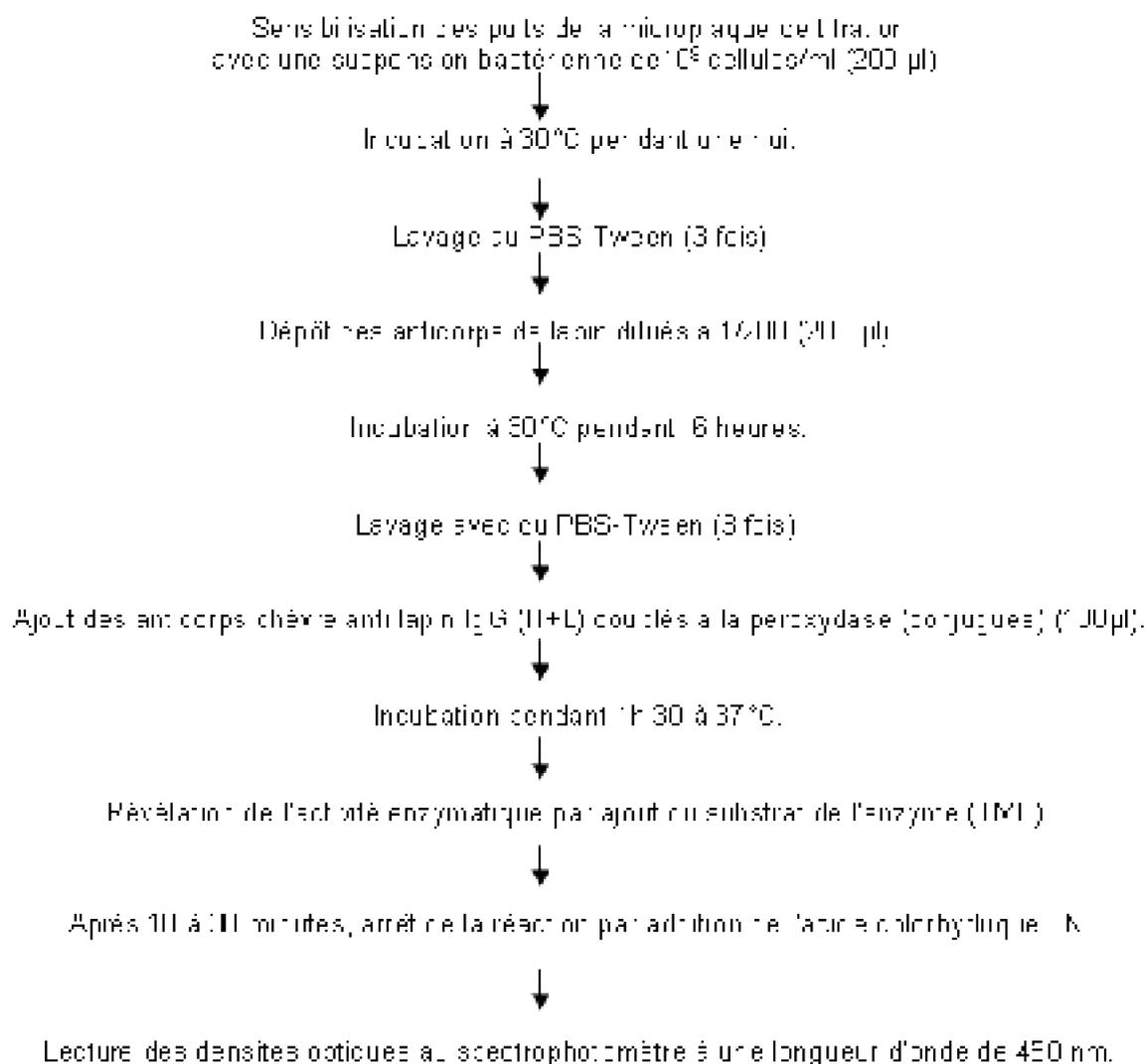
Les saignées sont réalisées une semaine après la dernière injection. Le sang récupéré, est coagulé pendant 30min à température ambiante, puis remué et centrifugé à 5000g pendant 15min à 4°C. Les immunosérums obtenus sont aliquotés et conservés à 4°C.

### **II.4.4. Technique sérologique**

---

Un test ELISA indirect a été réalisé selon le protocole de Arzac et Cleyet-Marel (1986). Dans un premier temps, nous avons déterminé les différentes concentrations de sérum (1/100, 1/200, 1/400, 1/600) avec l'isolat qui a induit sa production, dans le but de déterminer le titre optimal pour lequel les sera réagissent.

**Planche 1 :** Technique du test ELISA indirect.



Pour chaque plaque, des témoins sont réalisés avec des cupules sans bactéries.

Après la lecture au spectrophotomètre, le seuil de positivité a été calculé selon la formule suivante :

$X + 2 ET$

X: étant la moyenne des densités optiques des témoins, ET : Ecart type.

Les densités optiques supérieures à  $X + 2 ET$  sont considérées comme positives.

## II.5. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE (nodulation et fixation d'azote)

Pour la caractérisation symbiotique, nous avons utilisé la vermiculite comme support pour

l'inoculation des plants de pois chiche en culture monoxénique, de la même manière que le test d'authentification, à raison de trois répétitions pour chaque isolat et un témoin non inoculé. La mesure de l'A.R.A. (le potentiel de fixation d'azote), le nombre de nodules et leur poids frais, sont réalisés 6 semaines après le semis.

### **II.5.1. L'activité réductrice d'acétylène**

---

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique. Cette enzyme est capable de réduire l'acétylène ( $C_2H_2$ ) en éthylène ( $C_2H_4$ ) quand les organes fixateurs d'azote sont incubés dans une atmosphère contenant au moins 10% de  $C_2H_2$ . La quantité d'éthylène formé, dans ces conditions pendant un temps donné, correspond donc au flot total d'électrons transférés par la nitrogénase. La quantité d'acétylène diluable est, en ce sens, une mesure de l'activité réductrice de la nitrogénase dénommée A.R.A.

Le système racinaire à l'intérieur du pot est isolé de l'atmosphère extérieure par un sac en polyéthylène, la concentration de l'acétylène injectée dans l'enceinte est de 10 % du volume total du pot hermétiquement fermé, soit 2 ml dans notre cas, condition considérée comme saturante pour la nitrogénase (Balandreau et Dommergues, 1971). Après 2 min, 3 ml de gaz sont prélevés à l'aide d'une seringue, sont stockés dans des tubes "venoject", où un vide a été réalisé au préalable. Ces échantillons sont analysés au chromatographe en phase gazeuse. L'éthylène ( $C_2H_4$ ) réduit est exprimé en  $\mu$ mole formée par heure et par plante selon la méthode de Balandreau et Dommergues (1971).

### **II.5.2. Nombre de nodosités et leur poids frais**

---

Après la réduction de l'acétylène, les nodules sont détachés des racines, leur nombre et leur poids sont déterminés.

## **II.6. CARACTERISATION MOLECULAIRE**

L'utilisation de la méthode moléculaire permet de déterminer une diversité au niveau intraspécifique, basée, dans notre cas, sur la séquence de gène *nodC*. Un gène commun, essentiel pour la nodulation et spécifique des espèces de *Rhizobium*. En outre, la séquence *nodC* est relativement longue (1300 pb Laguerre *et al.*, 2001), ce qui permet, lors de l'amplification PCR, d'avoir de grands fragments d'ADN, donnant la possibilité d'assurer une spécificité maximale lors de la RFLP et d'exploiter les différences génétiques entre les régions *nodC* provenant de sols différents.

Ce gène utilisé par Laguerre *et al.* (2001) code pour le N-acetylglucosaminyl transférase. Il est impliqué dans la première étape de l'assemblage du facteur Nod et intervient également dans la détermination de la gamme d'hôte.

La liste des isolats bactériens utilisés pour cette caractérisation est présentée au niveau du tableau 3. Le choix des souches a été fait en tenant compte de la diversité

géographique, sur la base de leur importance vis-à-vis de la fixation de l'azote et présentant des caractéristiques culturelles homogènes. 12 isolats et 3 souches références ont été utilisés.

Tableau 3 : Isolats utilisés dans la caractérisation moléculaire.

Les isolats	Localité	Orientation Géographique
06-02-OG (p)	Oued Ghir	Est
10-02-LK (p)	Lakhdaria	Centre
16-02-OS (p)	Oued Smar	Centre
46-01-AK	Ain El Kihal	Ouest
46-01-HB	Hammam Bouhadjar	Ouest
46-02-EA (p)	El Amria	Ouest
46-01-EMB	El Malah (Benzergua)	Ouest
13-01-BS	Beni saf	Ouest
13-02-MN (p)	Mansourah	Ouest
48-02-BH (p)	Ben Kouhil	Ouest
13-01-HN	Hennaya	Ouest
14-01-SB	Sebaine	Ouest
ATCC51585 ref	Espagne	-
ATCC51586 ref	Inde	-
CP63 ref	Tunisie	-

### II.6.1. Amplification du gène par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les isolats sont cultivés sur YMA, récoltés après 48 heures pour limiter la surproduction de polysaccharides et sont utilisés directement pour la PCR (Laguerre *et al.*, 1997). Les séquences utilisées sont présentées dans le (Tableau 4).

Tableau 4 : Les amorces utilisées dans la PCR.

Amorce	Séquence nucléotidique 5'- 3'
NodCF (forward)	AYGTHGTYGAYGACGGTTC
nodCI (reverse)	CGYGACAGCCANTCKCTATTG

La PCR permet une amplification de 930 pb sur 1300 pb du gène *nodC* en utilisant les amorces. Ces amorces ont été désignées par comparaison de séquences du gène *nodC* chez *R. leguminosarum* bv. *Viciae*, *R. tropici*, *R. etli* bv *phaseoli*, *R. galegae*, *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii*, *Sinorhizobium* sp. NGR234, *M. loti*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* (Laguerre *et al.*, 2001).

### II.6.2. Condition d'amplification

Les conditions d'amplification ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µl comprenant : 5 µl de suspension bactérienne ; 2,5 µl d'un mélange des quatre dNTP (200 µM) ; le tampon de réaction (1,25 µl de détergent W-1; 2,5 µl du tampon Taq ; 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub>) ; 1,56 µl de chaque amorce (0,8 µM) ; 0,25 µl de Taq polymérase (1,25 U) (kit Invitrogen).

La réaction d'amplification a lieu dans un thermocycleur au laboratoire de biologie moléculaire à l'institut Pasteur d'Alger, dans les conditions de température suivantes : la dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes; 35 cycles dont chacun comprend une phase de dénaturation (1 min à 94°C), une phase d'hybridation (1 min à 55°C), une phase d'élongation (2 min à 72°C) et l'élongation finale à 72°C pendant 3 minutes.

Afin de visualiser les produits d'amplification générés, on dépose 5 µl sur un gel d'agarose 1% (poids/volume) dans du tampon TBE (Annexe 1), contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg de BET/ml de tampon de gel) (Sigma). Le marqueur utilisé est KiloBase DNA Marker (amersham pharmacia biotech).

### **II.6.3. Digestion enzymatique des amplifias d'ADN (PCR-RFLP)**

---

La RFLP ou l'étude du polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés consiste à digérer les fragments obtenus par PCR par des endonucléases de restriction. Les profils obtenus pour chacun des enzymes permettent, par leur combinaison, d'établir des groupes d'isolats.

Les amplifias (5µl) sont digérés dans un volume final de 20 µl, contenant 2 µl d'enzyme, 2 µl du tampon et 11 µl d'eau distillée. Les endonucléases utilisées sont les suivantes : *AluI*, *HaeIII*, *HpaI* (Sigma). Les conditions de réaction sont préconisées par le fabricant.

La révélation des produits de restriction se fait par migration sur gel d'agarose à bas point de fusion (Nusieve) à 2% (poids/volume), contenant 0,5 µg de BET/ml de tampon de gel (TBE). Le marqueur utilisé est le 100 Base-Pair Ladder (amersham pharmacia biotech).

## **II.7. ETUDE STATISTIQUE**

### **II.7.1. Analyse numérique**

---

Pour analyser tous les résultats recueillis, quatre matrices ont été construites. Une première à partir des caractères phénotypiques regroupant les caractères morphologiques, culturels et physiologiques.

Une deuxième matrice regroupant la dégradation des différents sucres par les souches (les monosaccharides, les disaccharides, les polyols et l'amidon), la troisième

---

matrice dite totale, regroupe les deux matrices précédentes en plus des réactions vis-à-vis des antibiotiques et des métaux lourds.

La quatrième matrice englobe les données recueillies à partir des profils obtenus par RFLP, représentant le nombre de fragments migrants (en prenant en considération les enzymes montrant des différences entre les isolats testés).

Ces données serviront pour la construction de dendrogrammes par la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) et le coefficient de Jaccard (J) à l'aide du programme NTSYS(Version 1.98) (Numerical Taxonomie and Multivariate Analysis System).

Le principe de l'analyse numérique, comme toute les méthodes de taxonomie numérique, est l'analyse des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) qui donne à tous les caractères considérés, la même valeur et le même poids ( 0 ou 1). Ces derniers sont comparés entre eux, ce qui nécessite de mesurer un indice ou coefficient de similitude. Pour notre cas, ça sera le coefficient de Jaccard :

$$S_{A,B} = \frac{a}{(a+b)}$$

dans lequel "a" est le nombre de caractères positifs pour les deux souches "A" et "B", et "b" le nombre de caractères différents (Meyer *et al.*, 1999).

Le logiciel utilisé pour la taxonomie numérique regroupe les individus sur la base de leurs affinités, en se référant à l'indice de ressemblance (similitude ou distance). Il hiérarchise ces groupements par des niveaux de ressemblance (classification ascendante hiérarchique de ces données). Les résultats sont représentés graphiquement sous forme de dendrogramme permettant de visualiser la structure hiérarchique des groupements très semblables.

Le logiciel NTSYS, nous a permis de construire un dendrogramme par la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), afin de rassembler les isolats et les souches de référence en groupes plus ou moins homogènes et montrer les degrés de similarité et de différence entre ces groupes.

Pour ne pas fausser l'analyse numérique et ainsi la hiérarchisation, les caractères non retenus pour l'analyse numérique sont ceux où les souches répondent de la même manière.

## II.7.2. Analyse de la variance

---

Une analyse de variance (ANOVA), par le logiciel STATITCF, est effectuée pour les composantes symbiotiques (nombre de nodule, poids frais des nodules et A.R.A.). Les calculs permettent de déterminer, d'une part, l'existence d'une éventuelle hétérogénéité entre les isolats, pour les composantes fonctionnelles (fixation et nodulation), et d'autre part, de classer ces isolats en fonction des moyennes de fixation, de nombre de nodules par plant et le poids frais de ces nodules, en utilisant le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5 %.



## III- RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1. Lieux de prélèvement (Sols)

#### III.1.1. Texture des sols

---

Les sols des sites de prélèvement des isolats de *Rhizobium* de pois chiche (Tableau 1) sont à texture limono-argileuse, limoneuse et argilo-limoneuse, ils ne présentent aucune spécificité régionale.

Selon le type de sol, des nodulations différentes ont été observées avec les souches de *Rhizobium leguminosarum* (May et Bohlool, 1983), les *Rhizobium* du *Leucaena* (Moawad et Bohlool, 1984) et le *Rhizobium* du pois chiche (Somasegaran *et al.*, 1988). Dans un sol riche en argile, un plus grand nombre de microhabitats protecteurs disponibles pour les bactéries, peut influencer la survie et la taille des populations rhizobiennes, particulièrement dans les sols exposés aux hautes températures ou à la dessiccation (Heynen *et al.*, 1988; England *et al.*, 1993; Ozawa, 1988).

#### III.1.2. PH des sols

---

Sur les 22 sols analysés, quatorze présentent un pH alcalin qui dépasse 8 : El-Harrouche, Ain El Kebira; Tamlouka pour l'Est, Lakhdaria, Oued Smar, Baraki pour le centre et Ain El Arbaa, Ain kihal, Hammam Bouhadjar, El Amria, El Malah (Benzergua), Beni Saf, Mansourah, Sebaine pour les régions de l'Ouest du pays (Tableau 1) Le pH le plus basique (8.80) se trouve au centre du pays (Oued Smar), celui qui se rapproche le plus de la neutralité (7.40) se situe à l'Est du pays (Ain Makhlouf). Cependant, aucune région (Est, Centre, Ouest) ne montre une particularité par rapport au pH, dans une même région le pH diffère d'une localité à une autre (Tableau 1).

### **III.1.3. Conductivité électrique des sols**

---

Selon les normes U.S.S.L. (1954), les sols salés se caractérisent par une conductivité électrique entre 1,4 et 2,4 ds/m. La CE du sol la plus élevée se trouve dans les localités de l'Ouest où 2,29 ds/m est notée pour Hammam Bouhadjar, 2,27 ds/m pour Ben Kouhil et 2,19 ds/m pour El Malah, suivies des localités de L'Est avec une conductivité électrique de 1,99 ds/m pour El-Harouch et Ain El Kebira. Selon la même référence, les sols de Lakhdaria et Baraki (région Centre) se classent parmi les sols non salés (respectivement 0.15 et 0.11 ds/m).

D'après les études sur les facteurs influençant la nodulation et la fixation de l'azote par les *Rhizobium* (Rupela et Saxena, 1987; Bordeleau et prévost, 1994; Vlassak et Vandrleyden, 1997; Zahran, 1999), les résultats de l'analyse des sols (Tableau 1) montrent que le pH, la salinité ainsi que la texture des sols sont favorables à la survie des *Rhizobium* et par conséquent, à la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique.

## **III.2. Tests d'authentification des isolats**

Le test d'authentification a été utilisé sur différents substrats et milieux (Figure 5). L'inoculation des graines, lors de la mise en culture par les isolats, a comme objectif de confirmer la spécificité des isolats et leur infectivité. Les nodules ont été obtenus uniquement sur les racines du pois chiche semé sur vermiculite, sciure de bois, sols stériles et sable de rivière stérile. Les meilleurs résultats, par rapport au nombre de nodules et l'état de la plante, ont été obtenus sur vermiculite et sciure de bois. Par contre, sur le milieu minéral gélosé et liquide, nous n'avons pas obtenu de nodules, cela confirme les travaux de Vincent (1970), qui a trouvé que l'inoculation de certaines légumineuses, notamment les légumineuses à grosses graines, donne de meilleurs résultats sur vermiculite que sur milieu minéral gélosée.

## **III.3. CARACTERISATION phénologique DES ISOLATS**

Les caractères phénotypiques servent de base pour la classification polyphasique; ils

---

peuvent donner des indications sur la position taxonomique des isolats, mais ne peuvent être employés seuls dans l'analyse taxonomique.

#### III.3.1. Les caractères morphologiques

---

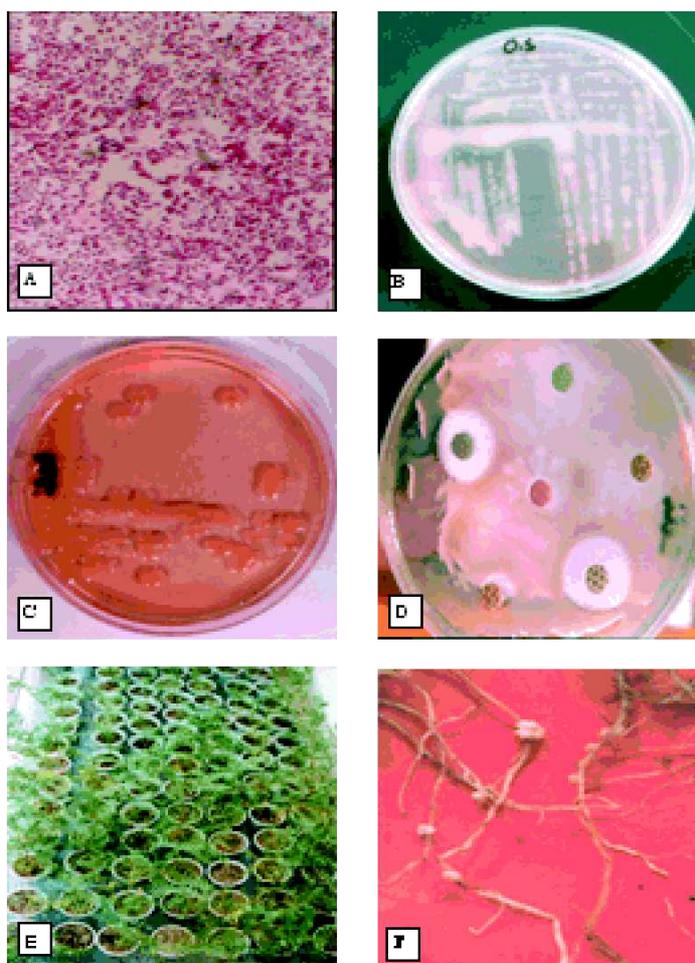
Dans les études de caractérisation des *Rhizobium*, la taille des colonies est peu citée, car elle ne représente pas un caractère discriminant pour leur classification. Dans notre étude, après 48 heures d'incubation sur milieu YEM, les isolats ont montré que la taille des colonies varie entre 1 mm et 2 mm (Tableau 5).

Somasegaran et Hobben (1985) ont rapporté que la taille des colonies peut varier de 1 mm pour les souches de *Rhizobium* à croissance lente (ex. *Lupinus*) et 4 à 5 mm pour les souches à croissance rapide (ex. *Sesbania*). Nour *et al.* (1994b, 1995) citent une taille des colonies, après 3 à 5 jours d'incubation à 28°C, de 2 à 4 mm de diamètre pour les souches de *Mesorhizobium ciceri* et de 2 mm pour les souches de *Mesorhizobium mediterraneum*.

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des isolats après 48 heures d'incubation.

**Thème Essai de caractérisation de quelques isolats de Rhizobium nodulant le pois chiche (Cicer arietinum L.)**

Codes des souches	Diamètre des colonies (mm)	Forme	Couleur sur YMA (Rouge Congo)	Opacité	EPS	Texture des EPS
21-02-EH	<1	circulaire	Légèrement rose	translucide	+	gluante
19-01-AK	1-2	circulaire	rose	translucide	++	visqueuse
24-01-TM	2	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	visqueuse
24-01-AM	<1	circulaire	Légèrement rose	translucide	++	visqueuse
06-02-OG	1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
42-02-TP	1-1,5	circulaire	rose	opaque	++	gluante
10-02-LK	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
16-02-OS	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
16-01-BK	2	circulaire	Légèrement rose	translucide	++	visqueuse
46-01-AL	2	circulaire	Légèrement rose	translucide		visqueuse
46-01-AK	1	circulaire	Légèrement rose	opaque	+++	gluante
46-01-HB	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
46-02-EA	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	visqueuse
46-01-AK1	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
46-01-EMA	1,5-2	circulaire	Légèrement rose	translucide	++	gommeuse
46-01-EMB	1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
13-01-BS	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
13-02-MN	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
48-02-BH	1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
13-01-HN	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	+++	gluante
14-01-SB	1-1,5	circulaire	Légèrement rose	opaque	+++	gluante
14-01-RA	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	visqueuse
ATCC51585	1,5-2	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
ATCC51586	<1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante
CP63	1	circulaire	Légèrement rose	opaque	++	gluante



**Figure 7 :** (A) Coloration de Gram; (B) Isolat 16-02-OS sur milieu YMA; (C) Isolat 48-02-BH sur milieu YMA avec du Rouge Congo; (D) Antibiogramme de l'isolat 48-02-BH; (E) Test d'authentification sur vermiculite; (F) Nodosité obtenue sur racine de pois chiche après le test d'authentification.

Différentes couleurs et textures sont citées dans la littérature pour décrire les EPS des *Rhizobium* (Vincent, 1970; Somasegaran et Hobben, 1985). Une petite variation dans la production et la densité des EPS a été observée entre les isolats. A l'exception de l'isolat 21-02-EH, les EPS sont produites d'une manière importante, particulièrement chez les isolats 46-01-Ak, 13-01-HN et 14-01-SB (Tableau 5)

Les souches de *Rhizobium*, sur milieu YEM-Rouge Congo, apparaissent faiblement rose, car elles absorbent peu le Rouge Congo (Vincent, 1970; Somasegaran et Hobben, 1985). Dans notre étude, une absorption faible du Rouge Congo a été constatée chez tous les isolats mis à part les isolats 19-01-AK et 42-02-TP qui ont montré une absorption plus importante (Tableau).

En générale, et d'après les caractères morphologiques des isolats après 48 h d'incubation sur milieu YMA, les colonies de *Rhizobium* isolées du pois chiche sont circulaires, absorbent peu le rouge Congo et montrent des EPS opaques à texture gluante (Figure 7).

### III.3.2. Caractères cultureux

#### III.3.2.1. Temps de génération

Le temps de génération a été utilisé, pendant longtemps, dans la distinction des espèces de *Rhizobium* (Vincent, 1970; Jordan, 1982; Somasegaran et Hobben, 1985). Dès les premiers repiquages une différence très nette a été observée dans le temps de croissance des colonies bactériennes. En effet, le calcul du temps de génération (à partir des mesures recueillies sur spectrophotomètre) montre une grande variabilité entre les isolats.

Tableau 6 : Caractéristiques culturelles des isolats.

Isolats	Temps de génération (h)	Mobilité sur mannitol	pH du milieu de culture	Croissance sur milieu minimum
21-02-EH	7,56		5,45	
19-01-AK	3,09	+	6,07	-
24-01-TM	3,40	+	6,15	-
24-01-AM	4,63	+	5,55	-
06-02-OG	4,53	+	4,72	+
42-02-TP	3,55	+	6,42	-
10-02-LK	9,45	+	6,87	-
16-02-OS	4,47	+	5,88	-
16-01-BK	2,63	+	6,22	+
46-01-AL	4,32	+	6,79	-
46-01-AK	5,28	+	5,92	+
46-01-HB	4,55	+	6,77	-
46-02-EA	5,16	+	5,16	-
46-01-AK1	3,10	+	5,16	-
46-01-EMA	2,94	+	5,53	-
46-01-EMB	1,93	+	6,70	-
13-01-BS	2,93	+	6,31	-
13-02-MN	3,51	+	5,70	-
48-02-BH	4,75	+	6,30	+
13-01-HN	5,39	+	6,10	-
14-01-SB	1,89	+	6,02	+
14-01-RA	4,28	+	4,99	-
ATCC51585	4,28	+	5,62	+
ATCC51586	6,41	+	6,71	-
CP63	2,41	+	5,63	-

Ces isolats peuvent être réunis en trois groupes : des isolats à croissance rapide, dont le temps de génération est inférieur ou égal à 3 heures, des isolats à croissance intermédiaire, dont le temps de génération est supérieur à 3 heures et inférieur à 6 heures

et des isolats à croissance lente, dont le temps de génération est supérieur à 6 heures (Tableau 6).

Le groupe à croissance rapide renferme plus de 33 % des isolats testés : 19-01-AK, 16-01-BK, 46-01-AK1, 46-01-EMA, 46-01-EMB, 13-01-BS, 14-01-SB et CP63 (Figure 8). Le groupe de l'Est et du Centre sont représentés, respectivement, par les isolats 19-01-AK et 16-01-BK, celui de l'Ouest est représenté par les isolats 46-01-AK1, 46-01-EMA, 46-01-EMB, 13-01-BS, 14-01-SB et la souche CP63. Le temps de génération le plus court (1,89 h) est réalisé par l'isolat 14-01-SB.

Le groupe à croissance intermédiaire réunit le plus grand nombre d'isolats, près de 58 % : 24-01-TM, 24-01-AM, 06-02-OG, 42-02-TP, 16-02-OS, 46-01-AL, 46-01-AK, 46-01-HB, 46-02-EA, 13-02-MN, 48-02-BH, 13-01-HN, 14-01-RA et ATCC51585. Il renferme les isolats appartenant aux trois régions ainsi que la souche de référence ATCC51585.

Le groupe à croissance lente est représenté par la souche ATCC51586 et les deux isolats 21-02-EH, 10-02-LK, ce dernier présente un temps de génération maximum de 9,45 h. Dans notre étude, les sols d'une même région (Est, Centre et Ouest) regroupent des *Rhizobia* avec différents temps de génération.

Les différences constatées dans le temps de génération des isolats étudiés, ont été confirmées par plusieurs travaux faisant état de l'existence de souches à croissance rapide et de souches à croissance lente nodulant le pois chiche (Jarvis *et al.*, 1983; Chakrabarti *et al.*, 1986; Cadahia *et al.*, 1986; Nour *et al.*, 1994; Maâtallah *et al.*, 2002). Par ailleurs, dans notre étude, aucune relation n'a été constatée entre la taille des colonies et leur temps de génération.

#### III.3.2.2. Mobilité sur mannitol

Sur milieu mannitol mobilité, tous les isolats ont montré une réaction positive (migration d'un trouble dans le milieu), c'est une caractéristique des *Rhizobia* (Vincent, 1970) (Tableau 6).

#### III.3.2.3. Acidification du milieu de culture

Tous les isolats testés ont tendance à acidifier le milieu après 5 jours d'incubation sur milieu YMB (Tableau 6). Selon le pH final du milieu de culture, qui varie entre 6.87 et 4.99, les isolats ont été classés en quatre groupes :

1<sup>er</sup> groupe : le pH final se situe entre 6,9 et 6,7. Il regroupe seulement les isolats des régions Ouest et centre 10-02-LK, 46-01-AL, 46-01-HB, 46-01-EMB et la souche ATCC51586.

2<sup>ème</sup> groupe : le pH final s'étend de 6,6 à 6,1. Il renferme les isolats 24-01-TM, 42-02-TP, 16-01-BK, 13-01-BS, 48-02-BH, 13-01-HN. Les trois régions sont représentées.

3<sup>ème</sup> groupe : le pH final se situe entre 6,1 et 5,0. Il regroupe les isolats 21-02-EH, 19-01-AK, 24-01-AM, 16-02-OS, 46-01-AK, 46-02-EA, 46-01-AK1, 46-01-EMA, 13-02-MN, 14-01-SB, ATCC51585 et CP63. Ce groupe réunit le plus grand nombre d'isolats

représentant les trois régions et les deux souches références ATCC51585 et CP63.

4<sup>ème</sup> groupe : compte les deux isolats les plus acidifiants avec un pH final du milieu de 4.99 et 4.72 respectivement pour les isolats 06-02-OG et 14-01-RA.

L'acidification du milieu de culture est une caractéristique des *Rhizobium* à croissance rapide (Jordan, 1984; Soamsegaran et Hobben, 1985). Les souches de pois chiche, malgré la variabilité qu'elles montrent dans leur temps de génération, acidifient le milieu de culture.

### **III.3.3. Caractérisation physiologique**

---

#### **III.3.3.1. Croissance sur milieu minimum**

Le milieu minimum se caractérise par l'absence de toute source d'azote. Dans notre collection, cinq isolats seulement : 06-02-OG, 16-01-BK, 46-01-AK, 48-02-BH, 14-01-SB, appartenant aux trois régions d'isolement et la souche de référence ATCC51585, ont montré une croissance sur milieu minimum (Tableau 6). Nour *et al.* (1994b), ont noté une bonne croissance sur milieu minimum pour toutes les souches de *Mesorhizobium* infectant le pois chiche.

#### **III.3.3.2. Tolérance aux températures extrêmes**

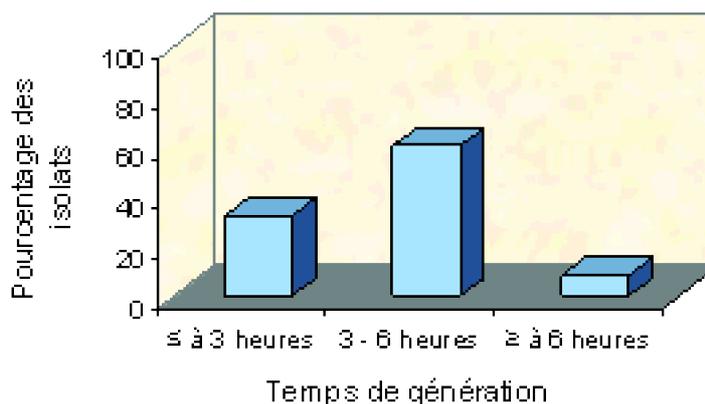
La température optimale de croissance de nos isolats est de 28°C (**Figure 9**). La croissance est inhibée à 8°C, relativement faible à 15°C, puisque seulement 36% des isolats arrivent à croître (19-01-AK, 24-01-TM, 24-01-AM, 42-02-TP, 16-01-BK, 46-01-AL, 46-01-AK1, 48-02-BH, ATCC51586) et 24% des isolats tolèrent une température de 42°C (21-02-EH, 19-01-AK, 24-01-TM, 24-01-AM, 42-02-TP, 46-01-AL, 13-01-BS). A 37°C, une bonne croissance est notée pour 52% des isolats, par contre à cette température la souche ATCC 51585 n'a pas pu croître avec onze des isolats testés (06-02-OG, 10-02-LK, 16-02-OS, 46-01-AK1, 46-01-EMA, 46-01-EMB, 13-02-MN, 46-01-HB, 48-02-BH, 13-01-HN). Les souches ATCC51585, ATCC51586 et CP63 ne montrent aucune croissance à 42°C.

Les isolats qui montrent une tolérance aux températures extrêmes se retrouvent dans les trois régions. De même qu'aucune relation n'a été trouvée entre la tolérance aux températures extrêmes et le temps de génération des isolats (Annexe III).

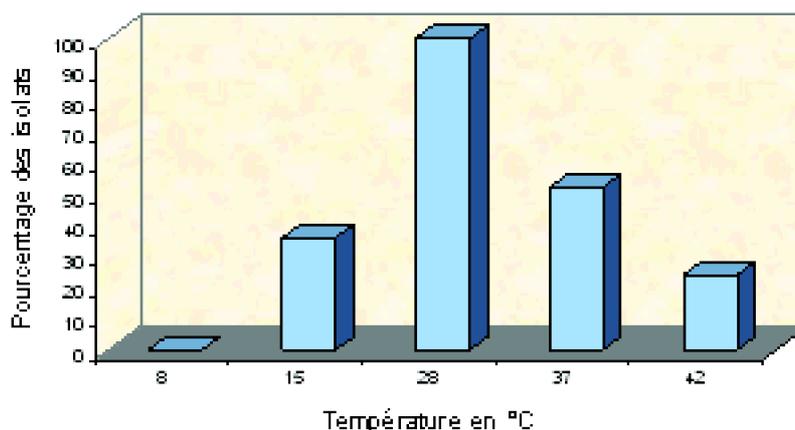
La température est l'un des facteurs environnementaux principaux, commandant la survie et l'établissement des Rhizobia dans la culture et dans le sol. Pour la plupart des *Rhizobium*, la gamme de température optimale de croissance varie entre 28 et 31°C, par conséquent, un grand nombre ne peuvent se développer au-delà de 37°C (**Gouffi et al., 1999**). Par ailleurs, Nour *et al.* (1994b, 1995) ont mentionné, pour la majorité des souches de *Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium mediterraneum*, une capacité à croître à une température maximale de 40°C. Maâtallah *et al.* (2002) ont obtenu certaines souches du pois chiche qui pouvaient croître à une température de 45°C.

### III.3.3.3. Tolérance aux différents pH

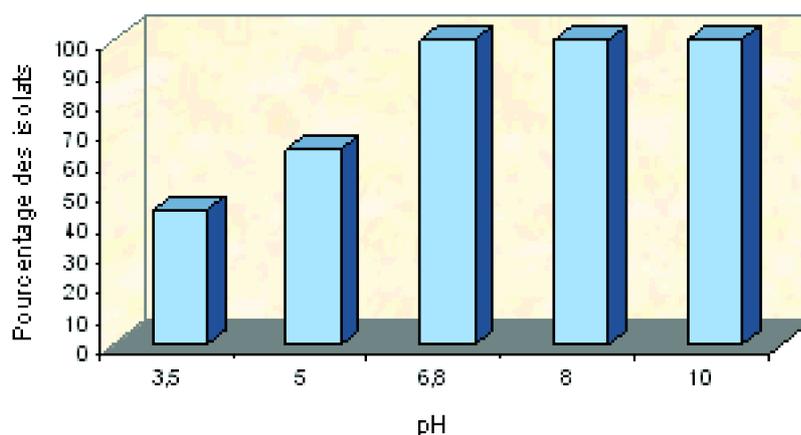
Les isolats ont été examinés pour leur aptitude à se développer à pH 3,5, 5, 6,8, 8 et 10 (Tableau 6). La figure 10, montre une large tolérance des isolats aux milieux alcalins. Tous les isolats parviennent à croître aux pH 8 et 10. Aux pH acides, la croissance est plus faible; 64% des isolats maintiennent leur croissance à pH 5 et 44% des isolats arrivent à croître dans un milieu à pH 3,5 (Annexe III).



**Figure 8 :** Distribution des isolats en fonction de leurs temps de génération.



**Figure 9 :** Effet de la température sur la croissance des isolats de *Rhizobium* nodulant le pois chiche.



**Figure 10 :** Effet du pH sur la croissance des isolats de *Rhizobium nodulant le pois chiche*.

Les souches ATCC51585, ATCC51586 et CP63 montrent un arrêt de croissance dans des milieux acides (pH : 3.5 et 5). La tolérance aux différents pH est notée chez les isolats appartenant aux trois régions d'isolement et chez les isolats ayant des temps de génération différents.

Il a été déjà rapporté que les souches de *Mesorhizobium* du pois chiche montrent une tolérance aux milieux à pH basique. Les résultats de Nour *et al.* (1994b, 1995) montrent que les souches de *Mesorhizobium ciceri* ont pu croître à des pH entre 5 et 10, alors que la limite de *Mesorhizobium mediterraneum* est de 9,5. Cette tendance à tolérer les milieux à pH élevé pourrait être liée aux pH alcalins qui caractérisent la plupart des sols d'origine des isolats étudiés (Maâtallah *et al.*, 2002).

#### III.3.3.4. Tolérance aux différentes concentrations de sel

La croissance des isolats, y compris ceux isolés des sols non salés, est optimale pour toutes les concentrations de NaCl testées (0,25; 0.5; 1 et 1.5 g/100ml) (Annexe III). Par contre, Rupela et Kumar Rao (1987) ont signalé qu'une concentration de 1% affecte négativement la croissance des *Rhizobium*. Cependant, Nour *et al.* (1994b, 1995) ont trouvé que les souches de *Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium mediterraneum* pouvaient tolérer jusqu'à 2% de NaCl (poids/volume).

Par ailleurs, le travail de Maâtallah *et al.* (2002) a démontré que la présence de 2% de NaCl dans le milieu de culture inhibe la croissance de 90% des isolats provenant des milieux non salins, alors que 40% des isolats des sols salins arrivent à croître sur ce milieu. Toutefois, la réaction des bactéries au stress salin (NaCl) dépend généralement du type de cellules et des osmoprotectants existant dans ces dernières (Ohwada *et al.*, 1998). Néanmoins, des Rhizobia de soja et de pois chiche ont montré une tolérance à une concentration de NaCl de 5,5 g/100 ml, avec des souches à croissance rapide plus tolérantes que des souches à croissance lente (Eaglesham *et al.*, 1984 in Zahran, 1999).

De plus, d'autres travaux indiquent que l'infection du cheveu racinaire et le processus de la symbiose sont plus sensibles aux fortes concentrations de sel que les rhizobia. En effet, les performances de la symbiose sous conditions salines semblent être déterminées, principalement, par la tolérance de la légumineuse (Velagaleti et Marsh, 1989; Soussi *et al.*, 1999).

### III.3.3.5. Analyse numérique

Onze paramètres ont été pris en considération pour la construction de la matrice regroupant les caractères cultureux et physiologiques (diamètre des colonies, couleur, opacité des EPS, temps de génération, acidification du milieu de culture, croissance sur milieu minimum, croissance à des températures de 15, 37, 42°C, croissance aux pH 3.5, 5). Les autres paramètres (morphologiques, cultureux et physiologiques) ont été éliminés, car ils se sont révélés être positifs ou négatifs pour l'ensemble des isolats. Les paramètres analysés, en utilisant la méthode UPGMA et le coefficient de Jaccard, ont permis la construction du dendrogramme ci-dessous (Figure 11)

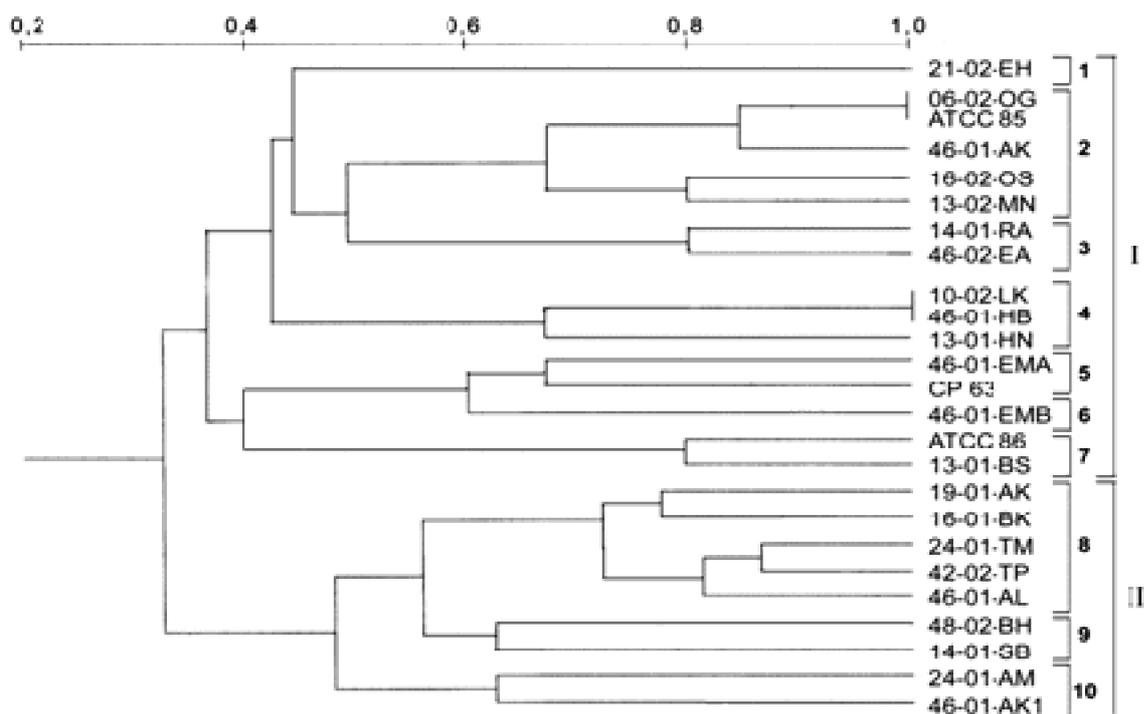
Le dendrogramme établi sur les caractères cultureux et physiologiques (Figure 11) montre une formation de deux grands groupes I et II (cluster), liés au niveau 0,32 de similarité relative. Le "groupe I" regroupe les souches de références avec la majorité des isolats de l'Ouest et du Centre, les isolats de l'Est sont représentés par l'isolat 21-02-EH et l'isolat 06-02-OG. Le "groupe II" renferme les isolats des trois régions d'isolement (Est, Centre et Ouest).

Au niveau de similarité relative (indice de Jaccard) de 62%, dix subclusters sont à considérer :

Le subcluster 1 est constitué par un seul isolat 21-02-EH, à 44% de similarité, il est séparé des subclusters 2 et 3 dont il était relié par la couleur des colonies et leur inaptitude à croître à une température de 15°C. A 44% de similitude, l'isolat 21-02-EH est considéré comme un isolat distinct pour les caractères physiologiques et cultureux.

Le subcluster 2 comprend les isolats 06-02-OG, ATCC51585, 46-01-AK, 16-02-OS, 13-02-MN, et le subcluster 3 comprend les isolats 14-01-RA, 46-02-EA. Les caractères qui les relient sont la couleur des colonies, l'opacité des EPS, l'incapacité à croître à des températures de 15, 37, 42°C et sur milieu acide (pH 5).

Dans les subclusters 2 et 4, respectivement, les isolats 46-01-HB avec l'isolat 10-02-LK et l'isolat 06-02-OG avec la souche référence ATCC51585 se regroupent à un pourcentage de similarité de 100%, ce qui pourrait signifier que les isolats de chaque subcluster appartiennent à une seule espèce.



**Figure 11 :** Dendrogramme montrant les similarités culturelles et physiologiques des isolats de *Rhizobium* de pois chiche.

Les subclusters 5, 6 et 7 sont constitués des souches CP63 et ATCC51586, les deux isolats de El Maleh (46-01-EMA, 46-01EMB) et l'isolat 13-01-BS.

Ces isolats se joignent par la couleur des colonies, l'incapacité à croître à une température de 15°C et sur milieu acide (pH de 3,5 et 5). Ces derniers sont liés aux clusters 4, 3, 2 et 1 pour former le "groupe" I par la couleur des colonies et leur incapacité de croître à une température de 15°C.

Le subcluster 8 rassemble les isolats 19-01-AK, 16-01-BK, 24-01-TM, 42-02-TP et 46-01-AL. Leurs colonies ont le même diamètre, ils peuvent croître à une température de 15 et 37°C ainsi que sur milieu à pH acide (3,5 et 5).

le subcluster 9 regroupe les isolats 48-02-BH et 14-01-SB. Ils se ressemblent du point de vue diamètre, couleur des colonies, opacité de leur EPS, croissance sur milieu minimum et milieu acide (pH de 3,5 et 5) et incapacité de croître à une température de 42°C.

Le subcluster 10 est représenté par deux isolats : 24-01-AMet 46-01-AK1 réunis de par leur diamètre, couleur des colonies, leur inaptitude à croître sur milieu minimum et à une température de 42°C ainsi que leur croissance à une température de 15°C et sur milieu acide (pH 3,5 et 5).

Le subclusters 8, 9 et 10 sont rassemblés dans le "groupe II" par leur capacité à croître sur milieu à pH acide (3,5 et 5).

L'analyse numérique des caractères cultureux et physiologiques montre une grande diversité des isolats, ainsi qu'une répartition hétérogène des régions représentées dans chaque subcluster. Néanmoins, elle a montré le rapprochement des isolats 06-02-OG et

46-01-Ak de la souche type du *Mesorhizobium ciceri* ATCC51585, l'isolat 13-01-BS de la souche ATCC51586 et l'isolat 46-01-EMA de la souche CP63. De plus, l'analyse numérique a permis de rassembler deux isolats de régions différentes (Centre et Ouest) 10-02-LK et 46-01-HB, qui ont montré les mêmes caractéristiques physiologiques et culturelles.

Par ailleurs, les isolats qui suscitent un intérêt particulier de par leur tolérance aux conditions extrêmes sont :

- Les isolats 19-01-AK, 16-01-BK, 24-01-TM, 42-02-TP et 46-01-AL, ils peuvent croître à une température de 15 et 37°C ainsi que sur milieu à pH acide (3,5 et 5).
- Les isolats 21-02-EH, 19-01-AK, 24-01-TM, 42-02-TP, 46-01-AL et 13-01-BS pour leur capacité à croître à 42°C
- Les isolats 48-02-BH et 14-01-SB pour leur aptitude à croître sur milieu minimum et milieu acide (pH de 3,5 et 5).
- Les isolats 24-01-AM et 46-01-AK1 pour leur croissance à une température de 15°C et sur milieu acide (pH 3,5 et 5).

#### III.3.4.Utilisation de différentes sources de carbone

---

Dans cette étude la majorité des composés carbonés testés ont été utilisés par les isolats de *Rhizobium* nodulant le pois chiche (Annexe III).

A l'exception du fructose, les monosaccharides sont dégradés par un grand nombre d'isolats, l'arabinose est utilisé comme source unique de carbone par 92% des isolats (Figure 12). Il est à signaler que l'utilisation des monosaccharides est surtout notée chez le groupe d'isolats prélevés des nodules de la région de l'Ouest (Figure 15).

Les disaccharides sont moins utilisés que les monosaccharides. Le cellobiose est le disaccharide le plus dégradé, utilisé par 84% des isolats (Figure 13). La comparaison des figures 15 et 16 montre une grande diversité dans l'utilisation des monosaccharides et disaccharides, mais des ressemblances peuvent être notées pour les profils de dégradation des isolats 21-02-EH et 16-02-OS, 06-02-OG et 46-01-AK1, 24-01-TM et 14-01-SB, 13-01-HN et ATCC51586, et l'isolat 14-01-RA et ATCC51585.

Tous les isolats de *Rhizobium* testés peuvent se développer sur milieu minimum contenant le glycérol, le mannitol et le sorbitol. La dégradation de l'amidon par les isolats est très faible, seuls les isolats 46-01-HB, 46-01-EMA, 14-01-RA appartenant aux régions de l'Ouest et la souche ATCC51586 l'utilisent.

En général, les isolats de *Rhizobium* appartenant aux trois régions ainsi que les souches de références ont utilisé les sucres testés, on ne remarque pas de distinction d'un groupe d'isolats représentant une région donnée (Est, Centre et Ouest) par rapport à un sucre ou par rapport au temps de génération, comme précédemment cité par Elsheikh et Wood (1989) et Maâtallah *et al.* (2002).

La comparaison des Figures 15, 16 et 17 montre que les isolats du groupe de l'Ouest

dégradent un plus grand nombre de composés carbonés; cela peut être expliqué par leur grand nombre, qui implique une plus grande diversité de profils de dégradation.

L'assimilation des sucres, comme seule source de carbone, par nos isolats est semblable à celle rapportée par d'autres auteurs (Elsheikh et wood, 1989; Nour *et al.*, 1994a; Maâtallah *et al.*, 2002). Nour *et al.* (1994a) ont mentionné que les souches *Mesorhizobium ciceri* ATCC51585 et la souche ATCC51586 pouvaient utiliser une variété de sucres mais aucune des deux souches n'a pu dégrader le xylose. Par contre, dans notre étude, 56% des isolats ont utilisé le xylose y compris la souche ATCC51585.

L'utilisation de différentes sources de carbone par les rhizobia est nécessaire pour leur survie dans le sol, Leur proximité de la racine des légumineuses, où suffisamment de carbone est assuré, leur assure un avantage dans des sols déficients en carbone (Vlassak et Vanderleyden, 1997).

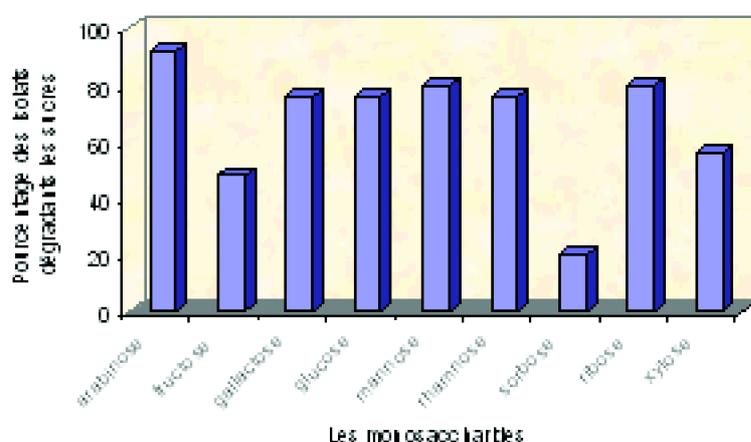


Figure 12 : Dégradation des monosaccharides par les isolats de *Rhizobium*.

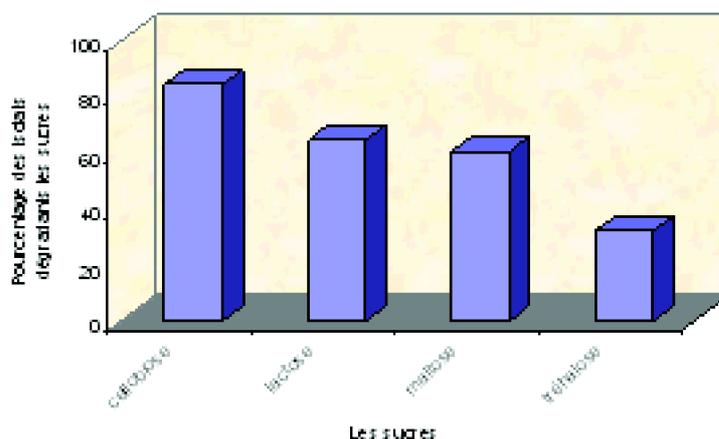


Figure 13 : Dégradation des disaccharides et un trisaccharide par les isolats de *Rhizobium*.

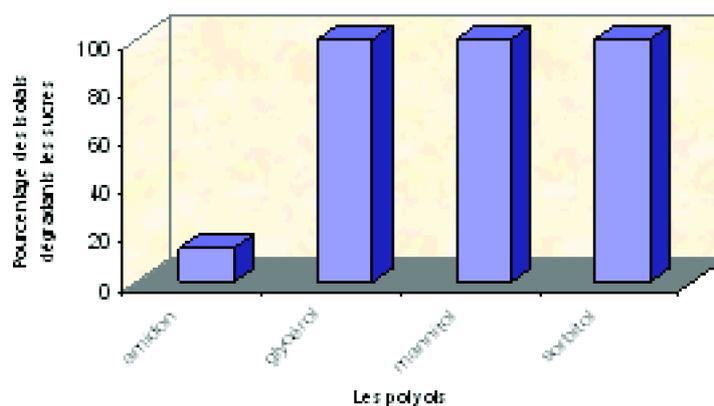


Figure 14 : Dégradation des polyols et amidon par les isolats de Rhizobium.

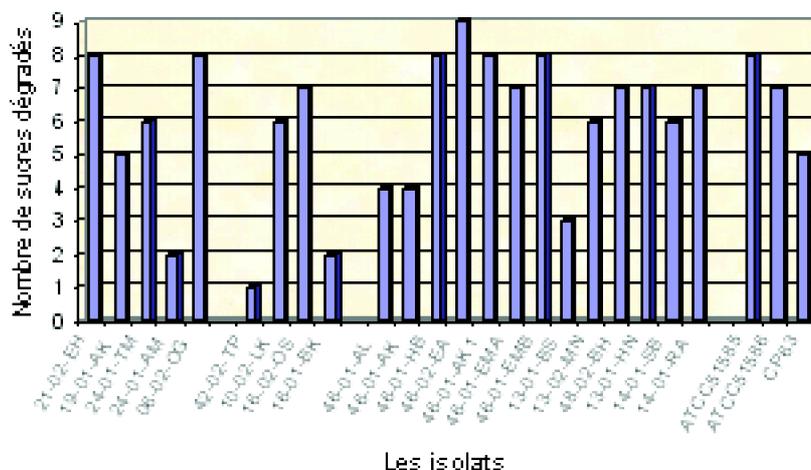


Figure 15 : Nombre de monosaccharides dégradés par les isolats.

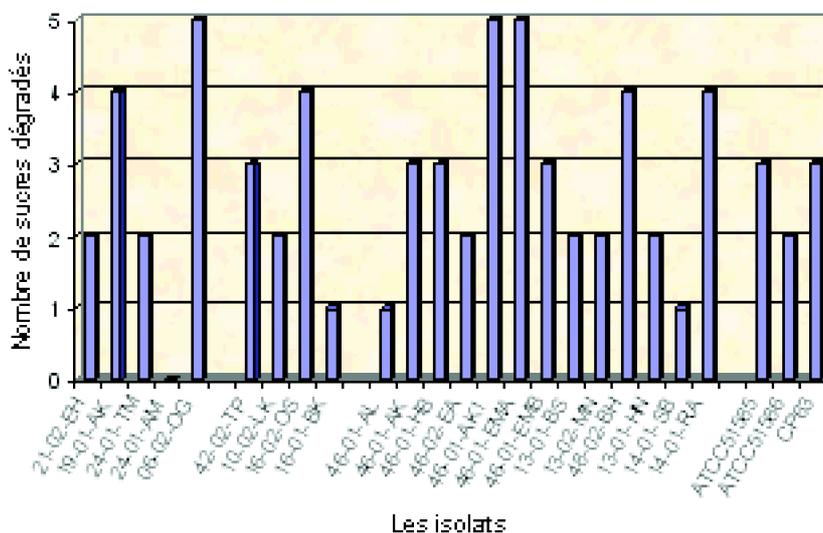


Figure 16 : Nombre de disaccharides dégradés par les isolats.

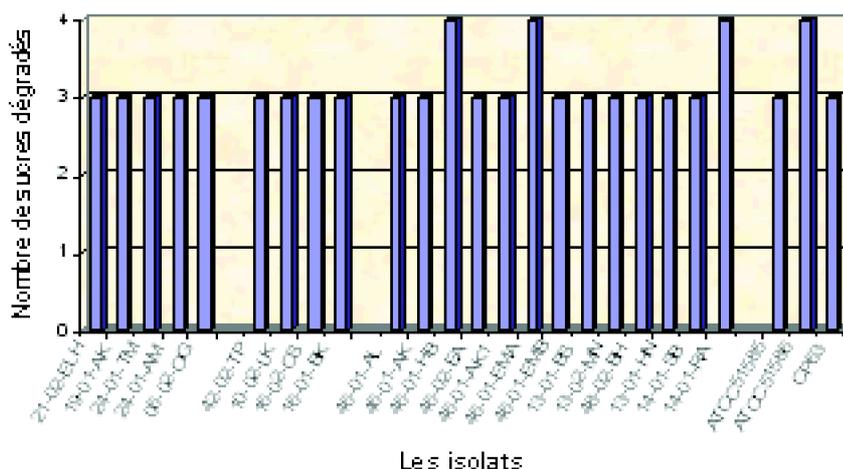


Figure 17 : Nombre de polyols et amidon dégradés par les isolats.

### III.3.4.1. Analyse numérique

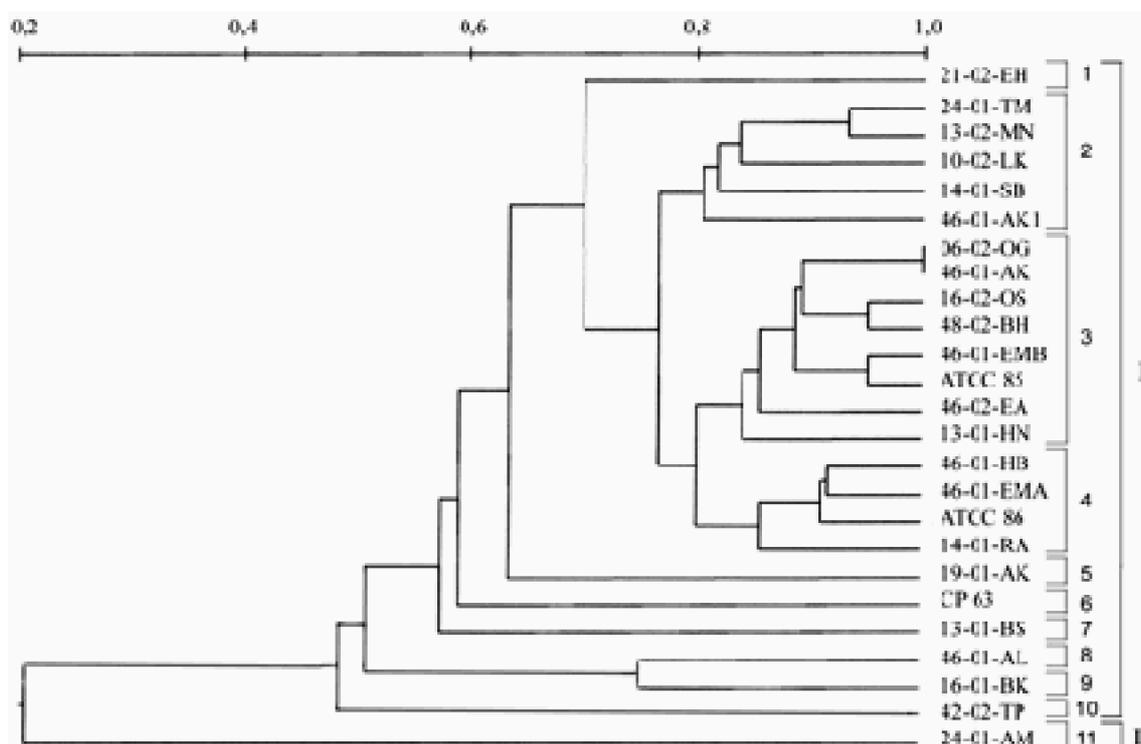
Dans l'analyse numérique, quinze sucres ont été pris en considération pour la construction du dendrogramme (arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose, ribose, xylose, cellobiose, lactose, maltose, raffinose, rhamnose, sorbose, tréhalose et l'amidon), la dégradation des polyols n'a pas été prise en compte car tous les isolats ont répondu positivement.

L'analyse montre la construction d'un arbre (Figure 18), qui au niveau de similarité relative de 0,20 se ramifie pour détacher l'isolat 24-01-AM constituant un subcluster à part, caractérisé par la dégradation de cinq sucres seulement, dont le sorbose, sur dix huit sucres utilisés (Annexe III).

Le subcluster 1 est représenté par un seul isolat (21-02-ELH) qui se détache des autres subclusters (2, 3, 4) par son incapacité à dégrader le galactose

Le subcluster 2 est composé des isolats 24-01-TM, 13-02-MN, 10-02-LK, 14-01-SB et 46-01-AK1 qui se caractérisent par la dégradation de l'arabinose, galactose, ribose, cellobiose et le rhamnose et par leur incapacité à dégrader le fructose, le raffinose, le sorbose, le tréhalose et l'amidon.

Le subcluster 3 réunit les isolats 06-02-OG, 46-01-AK, 16-02-OS, 48-02-BH, 46-01-EMB, ATCC51585, 46-02-EA et 13-01-HN pour leur capacité à utiliser les sucres suivants : arabinose, galactose, glucose, mannose, ribose, xylose, rhamnose et leur incapacité à dégrader l'amidon. Les isolats 46-01-AK et 06-02-OG montrent des profils de dégradation des sucres identiques.



**Figure 18** : Dendrogramme montrant les similarités pour la dégradation des sucres par les isolats de *Rhizobium* issues de nodosités de pois chiche.

Le subcluster 4 rassemble les isolats 46-01-HB, 46-01-EMA, ATCC51586 et 14-01-RA; ces isolats se distinguent par un plus grand nombre de composés carbonés assimilés (arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose, ribose, cellobiose, maltose et l'amidon). Les subclusters 1, 2, 3, et 4 forment un faisceau qui se caractérise par l'utilisation d'arabinose, glucose, mannose et le ribose. Entre le coefficient de similarité relative 0,20 et 0,60, quatre autres isolats se distinguent au fur et à mesure (19-01-AK, CP63, 13-01-BS, 46-01-AL, 16-01-BK, 42-02-TP) des autres clusters par leur incapacité à dégrader un sucre donné et montrent chacun un profil de dégradation différent des autres isolats.

Les subclusters 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 forment le "groupe I", ces isolats ont en commun l'incapacité de dégrader un disaccharide (sorbose). Le subcluster 11 renferme l'isolat 24-01-AM, formant à lui seul le groupe II.

On constate une grande diversité des isolats par rapport à l'utilisation des différents sucres. Les isolats sont regroupés dans différents subclusters, où plusieurs régions sont représentées.

### III.3.4.2. Comparaison entre les deux dendrogrammes

Les deux dendrogrammes représentant les caractères morphologiques, physiologiques et l'utilisation de différentes sources de carbone (Figure 11 et Figure 18) s'associent dans le regroupement des isolats 06-02-OG, 46-01-AK, 16-02-OS, 46-02-EA et la souche ATCC 51585; ce qui pourrait signifier leur appartenance à la même espèce.

L'isolat 21-02-EH pourrait être une espèce de *Rhizobium* différente des autres, car il

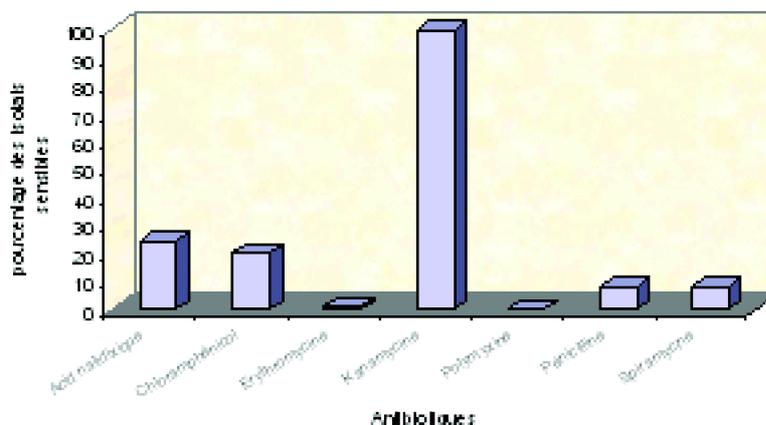
manifeste une particularité dans le comportement, se séparant en subcluster dans les deux dendrogrammes (Figure 11 et Figure 18).

### III.3.5. Résistance aux antibiotiques

---

Pour les concentrations des disques d'antibiotiques utilisés, tous les isolats montrent une sensibilité au même antibiotique qui est la Kanamycine (30UI) (Annexe III). Onze isolats seulement : 19-01-AK, 24-01-TM, 24-01-AM, 42-02-TP, 16-01-BK, 46-01-AL, 21-02-EH, 46-01-EMA, 14-01-RA, ATCC51586 et CP63 montrent une sensibilité à un deuxième antibiotique avec un pourcentage de 24% pour l'acide nalidixique (30 µg) et 20% pour la Chloramphénicol (30 µg). Deux isolats uniquement sont sensibles à trois antibiotiques 46-01-EMA pour la Chloramphénicol et l'Erythromycine (15UI) et la souche ATCC51585 pour la Chloramphénicol et la Spiramycine (100µg). Les deux isolats 46-01-EMB, 48-02-BH sont sensibles à la Pénicilline (6 µg) et tous les isolats de *Rhizobium*, infectant le pois chiche, montrent une résistance envers la Polymyxine (300UI). Nos résultats corroborent ceux trouvés par Nour *et al.* (1994a), concernant la résistance des souches au Chloramphénicol et l'acide nalidixique.

L'étude de la résistance/sensibilité des isolats de *Rhizobium* de pois chiche, montre encore que leur lieu d'origine n'a aucune relation avec leur réaction à l'égard des antibiotiques testés.



**Figure 19 :** Effet des antibiotiques sur la croissance des isolats de *Rhizobium nodulant le pois chiche*.



mêmes isolats sensibles vis-à-vis du mercure, du cobalt et du zinc (métaux lourds) (Annexe III).

Le regroupement des isolats selon leur origine et leur résistance à l'égard des métaux lourds indique que ceux des régions de l'Est et du centre du pays montrent une légère sensibilité vis-à-vis des métaux lourds par rapport à ceux des régions de l'Ouest. Les isolats selon leur temps de génération ne montrent pas une résistance ou sensibilité particulière aux métaux lourds.

### **III.3.7. Analyse numérique**

---

La matrice phénotypique a été construite en prenant en considération la matrice culturale et physiologique et la matrice qui a permis l'élaboration du dendrogramme des sucres utilisés par les isolats de *Rhizobium* nodulant le pois chiche, ainsi que les résultats de l'antibiogramme et la résistance des isolats aux métaux lourds. Cela a permis d'analyser 35 paramètres par la méthode UPGMA et le coefficient de Jaccard aboutissant à la construction du dendrogramme total (Figure 22).

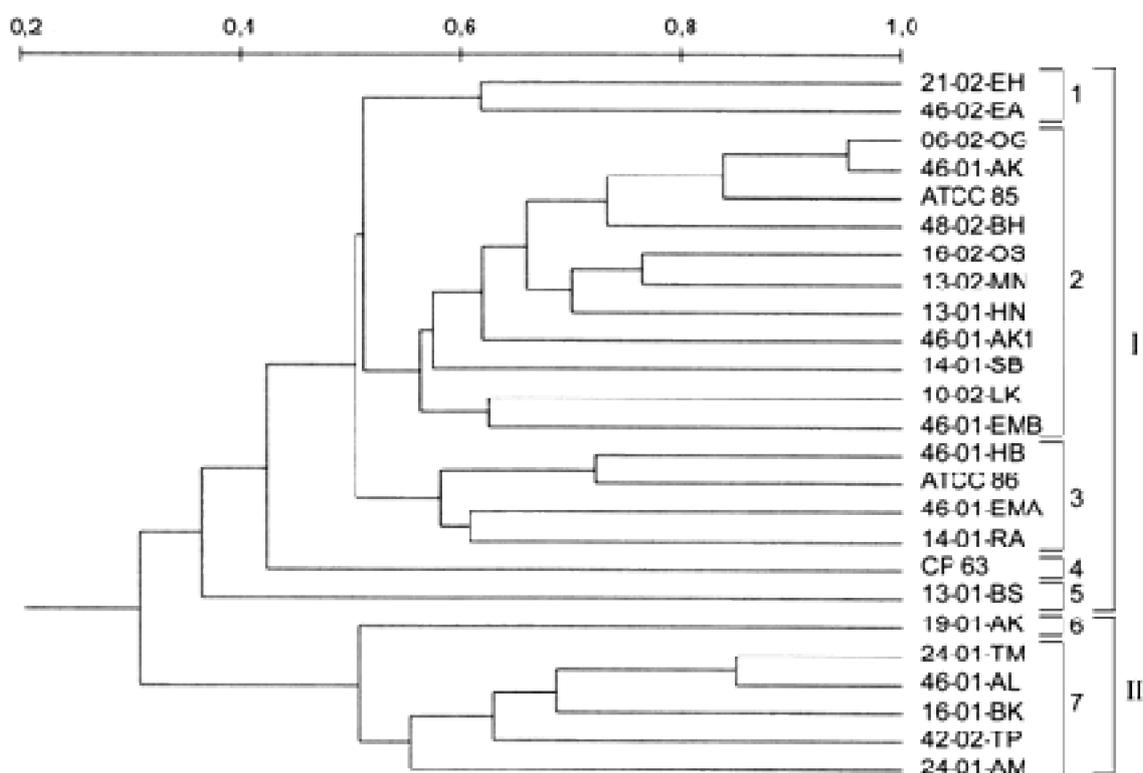
L'analyse numérique de la matrice totale montre que les isolats se séparent en deux groupes I et II au niveau 0,31 de l'indice de similarité. Le "groupe II" cumule majoritairement les isolats de l'Est et du Centre et le "groupe I", qui est plus important en nombre d'isolats, regroupe surtout les isolats de l'Ouest et les souches références.

Les caractères phénotypiques regroupent les isolats, au niveau de similarité relative de 0,55, en sept subclusters :

Le subcluster 1 est composé des isolats 21-02-EH et 46-02-EA (de la région Est et Ouest).

Le subcluster 2 réunit les isolats 06-02-OG, 16-02-OS, 10-02-Lk et sept isolats de l'Ouest représentés par 46-01-AK, 48-02-BH, 13-02-MN, 13-01-HN, 46-01-AK1, 14-01-SB, 46-01-EMB avec la souche ATCC51585.

Le subcluster 3 renferme les isolats 46-01-HB, 46-01-EMA, 14-01-RA et la souche ATCC51586. Les isolats CP63 et 13-01-BS se séparent des autres clusters et forment à eux seuls, respectivement, les subclusters 4 et 5.



**Figure 22 :** Dendrogramme montrant les similarités phénotypiques des isolats de *Rhizobium* du pois chiche.

Les subclusters (1, 2, 3, 4 et 5) forment le "groupe I". Ils se rapprochent par la couleur des colonies, leur résistance à l'acide nalidixique (antibiotique) et leur sensibilité au cobalt et au zinc (métaux lourds).

Le "groupe II" comprend, le subcluster 6 formé par l'isolat 19-01-AK et le subcluster 7 comptant les isolats 24-01-TM, 46-01-AL, 16-01-BK, 42-02-TP, 24-01-AM. Ce groupe se caractérise par les isolats qui peuvent croître sur milieu YEM à des températures de 15 et 37°C, peuvent supporter l'acidité du milieu (pH 3,5 et pH 5), sont sensibles à l'Acide nalidixique et sont résistants au zinc et au cobalt.

### III.3.8. Discussion

Le dendrogramme phénotypique (total) regroupant les caractères cultureux, physiologiques, assimilation des sucres, antibiogramme et la tolérance aux métaux lourds, devrait être le plus discriminant dans la distribution des isolats et les souches de références, car il regroupe le maximum de paramètres pour les différencier. L'obtention des sept groupes phénotypiques pourrait stipuler l'existence de plusieurs espèces génomiques dans les sols Algériens.

On remarque que certains isolats qui se retrouvent groupés dans des subclusters pourraient être des isolats représentant une même espèce de *Rhizobium* de pois chiche, car au delà des caractères morphologiques, d'autres caractères les rassemblent (dégradation des sucres, croissance à différentes températures, pH, antibiotiques, métaux

lourds).

En effet, les isolats 21-02-EH (région de l'Est) et 46-02-EA (région de l'Ouest) se détachent du subcluster 2 (Figure 22), et pourraient appartenir à une même espèce de *Rhizobium* du pois chiche.

Les souches de référence ATCC51586 et CP63 utilisées dans cette étude, appartiennent à l'espèce *Mesorhizobium* sp. Nour *et al.* (1994a, 1995), ont trouvé que la souche ATCC51586 est très proche de la souche *Mesorhizobium mediterraneum*. La souche ATCC51585 est la souche type de l'espèce *Mesorhizobium ciceri* (Nour *et al.*, 1994b).

Selon la distribution des isolats dans la figure 22, des hypothèses pourraient être avancées :

- Les isolats 06-02-OG, 46-01-AK, 48-02-BH, 16-02-OS, 13-02-MN, 13-01-HN, 46-01-AK1, 14-01-SB, 10-02-LK et 46-01-EMB sont regroupés avec la souche ATCC51585, la possibilité de leur appartenance à l'espèce *Mesorhizobium ciceri* n'est pas à exclure.
- Les isolats 46-01-HB, 46-01-EMA et 14-01-RA sont rattachés avec la souche ATCC51586; ils pourraient représenter une même espèce.
- La souche CP63 se distingue de la souche ATCC51586, elle pourrait, éventuellement, représenter une espèce distincte. Les isolats 13-01-BS, 19-01-AK se placent aussi dans des subclusters différents l'un de l'autre.
- Les isolats 24-01-TM, 46-01-AL, 16-01-BK, 42-02-TP et 21-01-AM se réunissent dans un même subcluster, ce qui implique leur appartenance à une même espèce de *Rhizobium* de pois chiche différente des autres isolats, d'autant plus que des différences sont notées par rapport aux autres subclusters dans leur résistance aux métaux lourds (mercure, cobalt, zinc, cadmium) et leur dégradation de moins de composés carbonés.

## **III.4. CARACTERISATION SEROLOGIQUE**

Théoriquement, les anticorps sont spécifiques lorsqu'ils sont capables de se lier fortement aux déterminants antigéniques qui ont incité leur synthèse, et se lient faiblement à des déterminants antigéniques différents.

La caractérisation sérologique des isolats dans cette étude, vise à différencier 25 isolats selon leur constitution antigénique par rapport aux cinq immunsérums produits contre les isolats 06-02-OG, 16-02-OS, 46-01-AK, 13-01-BS et CP63.

### **III.4.1. Spécificité et titre des immunsérums**

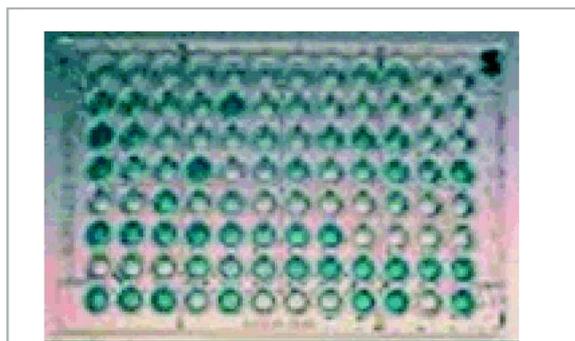
---

Afin d'étudier la spécificité des immunsérums, un test ELISA a été réalisé entre les cinq

---

isolats et leurs immunosérums à différentes dilutions. Il été nécessaire, avant d'aborder les tests ELISA entre les différents isolats et les cinq immunosérums, de déterminer le titre le plus élevé à utiliser pour ce test.

Le test ELISA a montré une activité des anticorps pour chaque dilution d'immunosérum utilisée (1/100, 1/200, 1/400, 1/600). Cependant, la dilution 1/200 a montré une réaction d'intensité maximale pour tous les immunosérums testés. Cette dilution des immunosérums sera utilisée pour les différents isolats, compte tenu des réactions croisées qui seront effectuées.



**Figure 23 :** *Plaques de microtitration montrant le test ELISA sur des isolats de Rhizobium avec l'anticorps chèvre anti lapin conjugué à la peroxydase et révélé par le TMB.*

#### III.4.2. Test ELISA

---

Les réactions anticorps/antigènes ont été révélées par le test ELISA indirect (Planche 1). L'intensité de la réaction colorée du test ELISA, en réaction homologue, est toujours supérieure à celle obtenue en réaction hétérologue. Cependant, chaque isolat a tendance à réagir assez fortement avec les autres immunosérums. C'est à partir des Lectures des densités optiques au spectrophotomètre à 450 nm qu'a été calculé la moyenne et l'écart type sur lesquels repose le classement des isolats présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** *Regroupement des isolats (sur la base d'une moyenne de 3 répétitions), d'après leur réactivité vis-à-vis des immunosérums.*

**Thème Essai de caractérisation de quelques isolats de Rhizobium nodulant le pois chiche (Cicer arietinum L.)**

Isolats	S1: 06-02-OG	S2: 16-02-OS	S3: 46-01-AK	S4: 13-01-BS	S5: CP63	Sérogroupe
21-02-EH	+	+	+	+	+	1
19-01-AK	+	+	+	-	+	2
24-01-TM	+	+	+	-	+	2
24-01-AM	+	+	+	-	+	2
06-02-OG	+	+	+	-	+	2
42-02-TP	+	+	+	+	+	1
10-02-LK	+	+	+	+	+	1
16-02-OS	+	+	+	-	+	2
16-01-BK	+	+	+	-	+	2
46-01-AL	+	+	+	+	+	1
46-01-AK	+	+	+	-	+	2
46-01-HB	+	+	+	+	+	1
46-02-EA	+	+	+	+	+	1
46-01-AK1	+	+	+	+	+	1
46-01-EMA	+	+	+	+	+	1
46-01-EMB	+	+	+	-	+	2
13-01-BS	+	+	+	+	+	1
13-02-MN	-	+	+	+	+	3
48-02-BH	+	+	+	+	+	1
13-01-HN	+	+	+	-	+	2
14-01-SB	+	+	+	+	+	1
14-01-RA	+	+	+	+	+	1
ATCC51585	+	+	+	+	+	1
ATCC51586	+	+	+	+	+	1
CP63	+	+	+	-	+	2

Le test ELISA indique que les isolats 21-02-EH, 42-02-TP, 10-02-LK, 46-01-AL, 46-01-HB, 46-02-EA, 46-01-AK1, 46-01-EMA, 13-01-BS, 13-02-MN, 48-02-BH, 14-01-SB, 14-01-RA, ATCC51585, ATCC51586 ont eu des réactions croisées avec tous les immunsérums (S1, S2, S3, S4, S5) établis respectivement contre les isolats (06-02-OG, 16-02-OS, 46-01-AK, 13-01-BS et CP63). Par contre, l'isolat 13-02-MN n'a pas réagi avec l'antisérum S1 (06-02-OG).

Parmi les isolats testés avec l'antisérum S4 (13-01-BS), seuls les isolats 19-01-AK, 24-01-TM, 24-01-AM, 06-02-OG, 16-02-OS, 16-01-BK, 46-01-AK, 46-01-EMB, 13-01-HN et CP63 ont réagi. Selon la réaction des immunsérums, on peut constituer trois groupes sérologiques par rapport aux cinq immunsérums utilisés.

### III.4.3. Discussion

Les résultats montrent que pratiquement tous les isolats ont eu des réactions hétérospécifiques avec les immunsérums utilisés, on ne distingue pas de spécificité d'un sérum par rapport aux isolats. Ceci indique que les isolats 21-02-EH, 42-02-TP, 10-02-LK, 46-01-AL, 46-01-HB, 46-02-EA, 46-01-AK1, 46-01-EMA, 13-01-BS, 13-02-MN,

48-02-BH, 14-01-SB, 14-01-RA, ATCC51585, ATCC51586 sont étroitement liés sur le plan antigénique avec les antisérums S1, S2, S3, S4, S5. Par contre, le sérum S4 (13-01-BS) ne partage pas de déterminants antigéniques contre dix isolats (19-01-AK, 24-01-TM, 24-01-AM, 06-02-OG, 16-02-OS, 16-01-BK, 46-01-AK, 46-01-EMB, 13-01-HN et CP63) ainsi que le sérum S1 (06-02-OG) avec l'isolat 13-02-MN.

L'absence de spécificité des immunsérums envers les isolats, peut être expliquée soit par le fait que ces isolats sont étroitement liés sur le plan antigénique et pourraient, en conséquence, être considérés comme appartenant aux sérogroupes apparentés, ou bien le manque de spécificité traduit les limites que présentent les antisérums polyclonaux pour la séparation des souches partageant quelques déterminants antigéniques.

Chaque cellule bactérienne est constituée de plusieurs épitopes, l'immunsérum formé à partir de cette même cellule peut contenir des anticorps dirigés contre différents sites antigéniques présents chez la bactérie. Le fait qu'une souche donnée réagisse avec plusieurs immunsérums ne signifie pas que se sont les mêmes sites antigéniques qui sont impliqués, cela dépend du pouvoir immunogène d'un antigène et de son caractère immuno-dominant ou immunodominé (Cigales-Rivero, 1984). Ce type de réaction est appelé réaction croisée et s'explique par une parenté structurale entre l'antigène inducteur et les autres antigènes. .

Plusieurs études de caractérisation de *Rhizobium* ont inclut la caractérisation sérologique (Monza *et al.*, 1992; Irisarii *et al.*, 1996; Santamaria *et al.*, 1997; Hungria *et al.*, 2001), une technique bien adaptée pour traiter un grand nombre d'échantillons. Cependant, dans notre cas, les résultats obtenus montrent les limites de la sérologie dans la différenciation des isolats de *Rhizobium* infectant le pois chiche, en raison de sa basse puissance distinctive. Les 25 isolats, utilisés dans cette étude, ont pu être rassemblés en trois groupes sérologiques seulement, des résultats similaires ont été donnés par Chergui *et al.* (1996), puisque sur dix huit isolats de *Rhizobium* de pois chiche seuls trois sérogroupes ont été obtenus. Néanmoins, ces regroupements traduisent l'existence d'une diversité sérologique qui peut être mise à profit pour la caractérisation d'isolats de *Rhizobium*. Cependant, l'exploitation de cette diversité sérologique sera facilitée par l'augmentation du degré de spécificité des immunsérums.

Par ailleurs, il est possible d'augmenter le nombre de groupes sérologiques en augmentant le nombre d'antisérums, ou en changeant les critères pour attribuer les échantillons, mais il est impossible de choisir à priori les isolats contre lesquels des antiséra doivent être établis afin d'obtenir une discrimination maximale.

Différentes limites des sera polyclonaux ont été décrites. Les traitements physiques et chimiques de l'antigène, le protocole d'immunisation, le type d'injection, l'utilisation d'adjuvants sont des facteurs pouvant affecter la spécificité des immunsérums (Ternynk et Avrameas, 1985). De plus, les résultats obtenus par Wright *et al.* (1986) sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux et polyclonaux pour l'identification des souches de *Rhizobium trifolii*, révèlent que les antisérums polyclonaux de souris manifestent une activité hétérosécificité significative avec des cultures de *R.trifoli* et toute autre espèce de *Rhizobium*. Alors que le test ELISA indirect avec des immunserums monoclonaux a pu détecter et différencier une souche de *Rhizobium trifolii* contre la quelle a été produit

l'antisérum.

Aucune relation n'a été constatée entre les isolats appartenant aux groupes à croissance rapide, intermédiaire et à croissance lente et l'activité hétérospécifique avec les antisérums testés (06-02-OG, 16-02-OS, 46-01-AK, 13-01-BS et CP63).

## **III.5. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE**

La fixation de l'azote atmosphérique reste une caractéristique très importante des *Rhizobium*. L'intérêt d'une caractérisation des isolats de *Rhizobium* reste limité si la diversité des caractères phénologiques et génétiques n'est pas complétée par les caractères fonctionnels (infectivité et efficacité).

La caractérisation symbiotique a comme objectif d'évaluer le potentiel de fixation des isolats et de déterminer les isolats les plus intéressants, afin d'évaluer l'infectivité et l'efficacité symbiotique des isolats du pois chiche.

Le principe de mesure employé pour estimer la capacité des isolats à fixer l'azote en symbiose est la mesure directe de l'A.R.A. La seule source d'azote possible pour la plante est la fixation par l'isolat introduit par inoculation des graines.

### **III.5.1. L'Activité réductrice d'acétylène**

---

Les données de la figure 24 représentent l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plants de pois chiche inoculés par des cultures monoxéniques des différents isolats. La majorité des plants de pois chiche inoculés ont montré une activité de la nitrogénase dans les nodosités, avec une divergence dans le taux de fixation entre isolats.

L'analyse de la variance (Annexe IV) met en évidence une différence hautement significative pour la fixation d'azote atmosphérique entre les isolats; le test de NEUMAN-KEULS au seuil de 5%, répartit les isolats en 10 groupes homogènes (Annexe IV).

L'isolat 46-02-EA forme à lui seul le groupe 'A', représentant l'isolat le plus efficace avec une moyenne de 6,98  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$ . Toutefois ce même classement, laisse apparaître que les isolats (06-02-OG, 48-02-BH), (CP63, 46-01-EMB), (ATCC51586), formant respectivement les groupes 'B, C, D' et représentant les trois régions, montrent une fixation d'azote élevée par rapport aux autres isolats constituant les groupes homogènes restants (Annexe IV). Par ailleurs, les isolats 46-01-EMA, 13-01-BS et 13-02-MN présentent un niveau très faible de fixation d'azote.

La moyenne la plus élevée d'azote fixé, au niveau des nodules, a été obtenue par l'isolat originaire de l'Ouest du pays (46-02-EA) (Figure 24). Cependant, les isolats de la région du centre 16-02-OS, 10-02-LK, 16-01-BK, 42-02-TP montrent une moyenne de fixation très proche des deux isolats de l'Est 21-02-EH, 24-01-TM et la souche ATCC51585, ils se caractérisent par une fixation faible (entre 2,78 et 1,78  $\mu\text{M}$  de

---

C2H4/h/plante) et forment le groupe homogène 'F' (Annexe IV)

### III.5.2. Nombre et poids frais des nodosités

---

#### III.5.2.1. Analyse de la variance du nombre de nodosités par plant

L'analyse de la variance de la moyenne du nombre de nodosités par plant de pois chiche indique une différence hautement significative entre les isolats étudiés (Annexe IV). Ces derniers, montrent une grande diversité dans leur capacité à infecter les plants de pois chiche (Figure 25). Cependant, la comparaison des moyennes (test de NEWMAN-KEULS au seuil de 5%) révèle cinq groupes homogènes où le groupe 'A' est constitué par un seul isolat 14-01-RA induisant le plus grand nombre de nodules (42 nodules).

En se basant sur la figure 25, nous remarquons une limitation de la moyenne du nombre de nodosités selon la région des isolats. Cette moyenne se situe entre 10 et 15 nodules pour les régions de l'Est, ne dépasse pas 26 nodules pour les régions du Centre et entre 10 et 28 nodules pour les régions de l'Ouest, avec une exception pour l'isolat 10-01-RA qui a donné 42 nodosités. Toutefois, le regroupement des isolats selon leurs régions d'isolement, montre une hétérogénéité pour le nombre de nodosités, surtout concernant la région de l'Ouest, où la moyenne du nombre de nodosités varie entre 42 nodules pour l'isolat 14-01-RA et 9,33 pour l'isolat 46-01-EMB. Nos résultats vont dans le même sens que le travail de Aouani *et al.* (2001) sur pois chiche en Tunisie, qui a montré des différences de nodulation des isolats selon leurs origines géographique.

D'autre part, une disproportion est constatée entre le nombre de nodosités et la quantité d'azote fixé. En effet, les isolats 46-02-EA, 06-02-OG, 48-02-BH, 46-01-EMB, CP63 qui fixent le plus d'azote, ne sont pas ceux qui présentent le nombre de nodosités le plus élevé, et inversement l'isolat 14-01-RA qui présente le plus grand nombre de nodosités a un très faible potentiel de fixation.

#### III.5.2.1. Analyse de la variance du poids frais des nodules

Le poids frais des nodules renseigne sur la grosseur des nodosités. L'analyse de la variance montre une différence très hautement significative du poids frais des nodosités entre les isolats (Annexe IV), leur classement selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5%, les répartit en quatre groupes homogènes.

Nous remarquons selon les figures 25 et 26 que les isolats 16-02-OS, 46-01-AK1, ATCC 51585, 48-02-BH, 14-01-RA, 46-01-EMA, 46-01-HB, 14-01-SB, 46-01-AL, 13-01-BS formant le groupe 'A', montrent un poids frais élevé des nodules. Ce poids élevé est dû au nombre important de nodules et non pas à la taille de ses derniers.

Toutefois, les isolats de la région de l'Est ont donné des nodules de petites tailles, car la moyenne du poids frais des nodosités n'a pas excédé 0,44 mg, néanmoins, ils se distinguent par un poids frais qui se rapprochent les uns des autres par rapport aux isolats des autres régions qui sont très hétérogène (Figure 26)

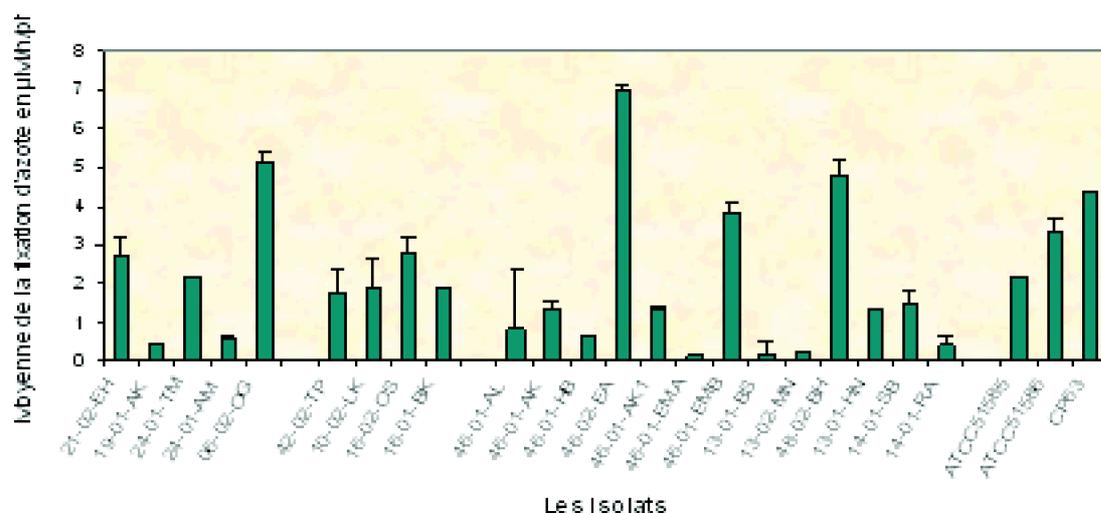


Figure 24 : Moyenne du potentielsymbiotique des isolats de Rhizobium nodulant le pois chiche.

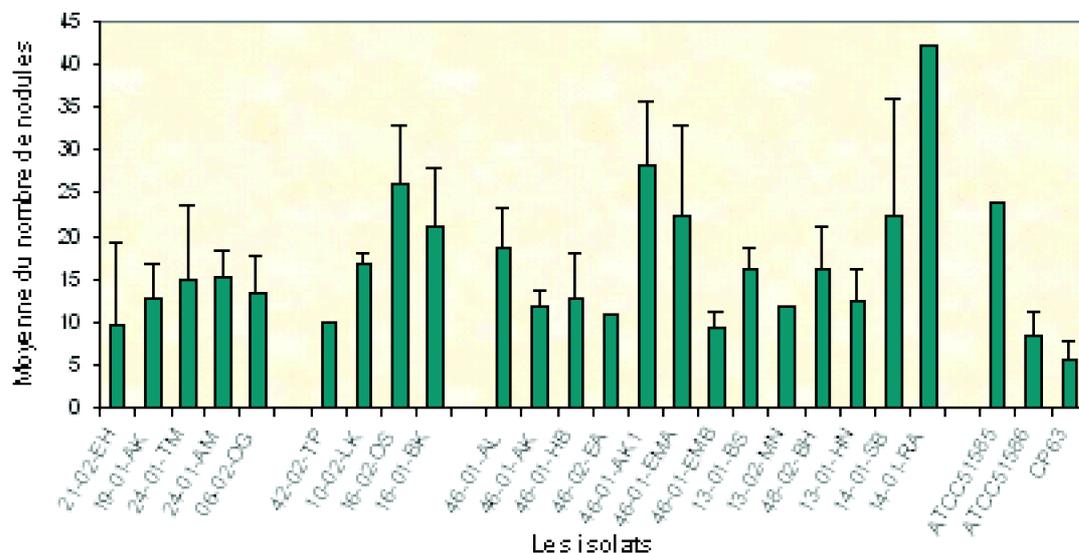
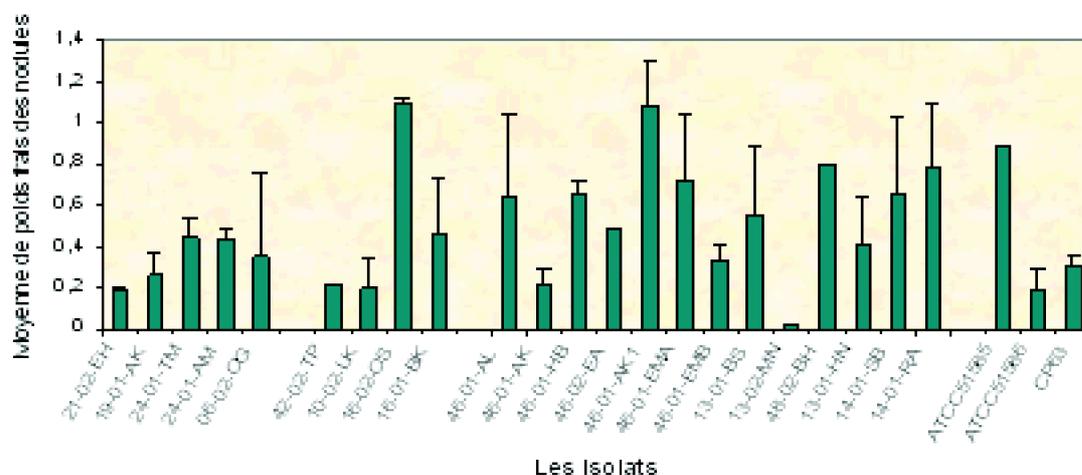


Figure 25 : Moyenne du nombre de nodules par isolat.



*Figure 26 : Moyen du poids frais des nodosités.*

### III.5.3. Discussion

La comparaison des résultats (efficacité, nombre et poids frais des nodosités par plant), démontre que malgré le nombre et poids élevés des nodules des régions du Centre, ces isolats ont une moyenne de fixation d'azote faible (entre 1,89 pour 16-01-BK et 2,78  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plt}$  pour 16-02-OS), comparée à celle des régions de l'Est (5,1578  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plt}$  pour 06-02-OG) et régions de l'Ouest (3,81  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{p}$  pour 46-01-EMB, 4,76  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plt}$  pour 48-02-BH et 6,98  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plt}$  pour l'isolat 46-02-EA). Une grande hétérogénéité est soulignée entre le nombre, le poids et l'efficacité des nodules induite par les isolats. Les isolats étudiés du *Rhizobium* du pois chiche ont montré une grande diversité dans leur capacité à infecter la plante et à fixer l'azote atmosphérique.

La caractérisation fonctionnelle des souches a permis de constater que l'infectivité de ces isolats est plus importante que leur efficacité et que le nombre de nodosité n'est pas un critère d'une bonne fixation de l'azote.

Nous remarquons que l'isolat qui fixe le plus d'azote vient d'une zone potentielle de culture de pois chiche (Ouest), mais cette zone renferme aussi les isolats les moins fixateurs d'azote. D'autre part, on constate qu'il n'y a pas de relation entre l'appartenance d'un isolat à une répartition géographique (**Figure 24**) et sa capacité à fixer l'azote.

Néanmoins, sur la base du potentiel de fixation de l'azote des isolats, les isolats; 06-02-OG, 46-02-EA, 46-01-EMB et 48-02-BH semblent être très intéressants.

Une bonne infectivité et surtout une bonne efficacité des souches de *Rhizobium* sont les premiers critères à retenir pour une sélection de ces derniers dans la perspective de préparer des inoculum efficaces. Nos résultats montrent qu'environ 14% des isolats testés possèdent ces propriétés. Cela nous mènerait à conclure que les sols Algériens pourraient souffrir de manque de souches autochtones de *Rhizobium* nodulant le pois chiche efficaces.

## III.6. CARACTERISATION MOLECULAIRE

### III.6.1. Amplification du gène par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La migration des amplifiats du gène *nodC* sur gel d'agarose 1% a montré qu'un produit de 930 pb environ a été généré chez tous les isolats amplifiés (Figure 27). Les bandes obtenues chez tous les isolats sont similaires et d'une intensité presque égale, ils correspondent à la taille des bandes obtenues par Laguerre *et al.* (2001).

L'amplification de la séquence *nodC* montre que les isolats 06-02-OG, 10-02-LK, 16-02-OS, 46-01-AK, 46-01-HB, 46-02-EA, 46-01-EMB, 13-01-BS, 13-02-MN, 48-02-BH,

13-01-HN, 14-01-SB appartiennent au genre *Mesohizobium*. La taille de l'amplifié est relativement grande pour apprécier l'approche de PCR-RFLP, puisqu'elle augmente la probabilité de la variabilité des séquences et ainsi, la capacité de différencier les isolats.

### III.6.2. Digestion enzymatique des amplifiés d'ADN (PCR-RFLP)

Les trois enzymes de restrictions utilisés (*AluI*, *HaeIII*, *HpaI*) ont digéré les fragments amplifiés du *nodC* de tous les isolats et ont produit trois profils de restrictions différents (Figure 28), Pour chaque enzyme, le nombre de profils diffère et varie de deux (*HpaI*) à trois profils (*AluI*).

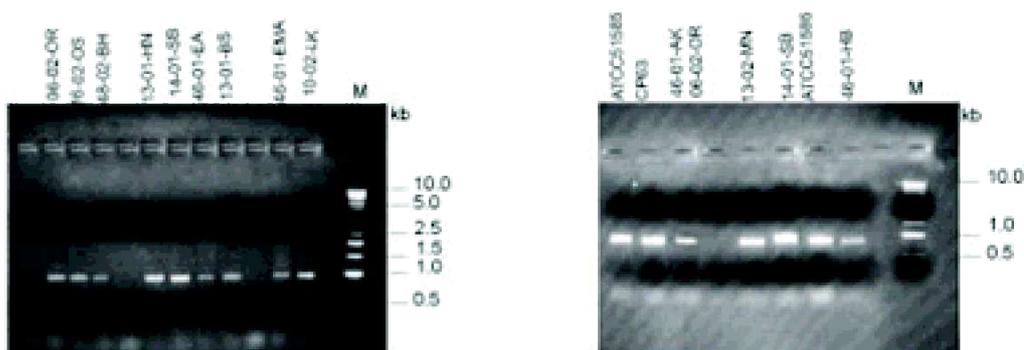


Figure 27 : Amplification par PCR du gène *nodC* des isolats *Rhizobium* infectant le pois chiche.



Figure 28a : Restriction par *HaeIII*.

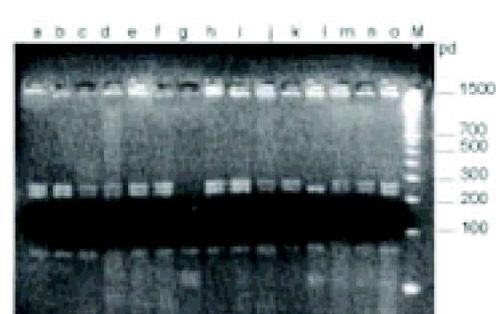


Figure 28b : Restriction par *AluI*.

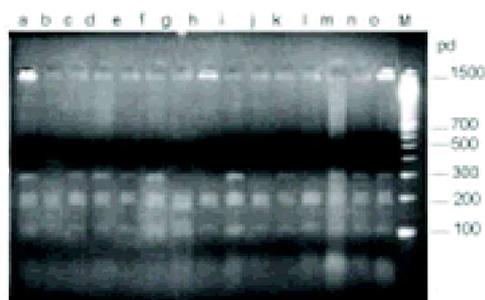


Figure 28c : Restriction par *HpaI*.

Figure 28 : Profils de restriction des isolats de *Rhizobium* nodulant le pois chiche.

**a** :13-01-HN, **b** : 14-01-SB, **c** : 13-01-BS, **d** : 46-01-EMB, **e** : 10-02-LK (p), **f** : ATCC51585, **g** : CP63, **h** : 06-02-OG, **i** : 48-02-BH, **j** : 46-01-AK, **k** : 46-02-EA, **l** : 46-01-HB, **m** : ATCC51586, **n**: 16-02-OS, **o** : 13-02-MN, **M** : marqueur.

La digestion des amplifias du gène *nodC* par l'enzyme *Hae*III donne le même profil de migration des bandes pour tous les isolats, hébergeant 03 bandes chaqu'un (Figure 28a), il s'agit du même profil que celui trouvé par Laguerre *et al.* (2001).

L'enzyme *AluI* offre trois modèles polymorphes abritant 03 bandes pour 02 modèles et 04 bandes pour un troisième modèle, il est le plus discriminant.(Figure 28b)

L'enzyme *HpaI* montre, selon la migration des bandes sur gel d'agarose Nusieve, deux modèle de profils. Tous les profils montrent 04 bandes par profil pour tous les isolats testés (Figure28c)

Les enzymes *AluI* et *HpaI* ont permis d'observer une variabilité à l'intérieur des isolats étudiés. Par contre, l'enzyme *Hae*III n'a pas permis d'établir une distinction entre les isolats.

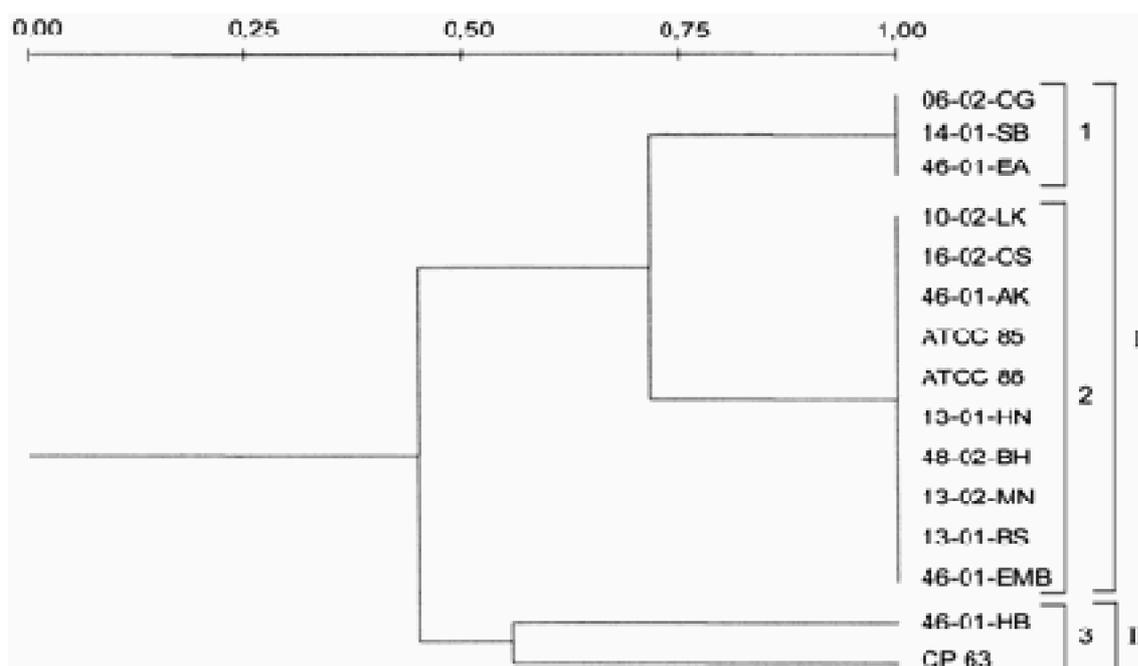
L'analyse des profils de restriction du gène *nodC* indique l'existence d'une diversité parmi les isolats analysés ainsi qu'entre les souches références.

#### III.6.3. Analyse numérique

---

Les profils électrophorétique issue de la RFLP du gène *nodC* analysés par la méthode UPGMA et le coefficient de Jaccard donne un arbre (dendrogramme) présentant deux embranchements formant deux groupes (clusters). Le "groupe I" et le "groupe II" sont rattachés à un coefficient de similarité relative de 0,45.

Le "groupe I" réunit les isolats 06-02-OG pour l'Est, 10-02-LK, 16-02-OS pour le Centre et 14-01-SB, 46-01-EA, 46-01-AK, 13-01-HN, 48-02-BH, 13-02-MN, 13-01-BS, 46-01-EMB pour l'Ouest, ainsi que les souches ATCC51585 et ATCC51586.



**Figure 29** : Dendrogramme établi par la méthode (UPGMA) basé sur le coefficient de Jaccard, dérivé de l'analyse des profils de restriction combinés du gène *nodC* amplifié, à partir des isolats de *Rhizobium*.

Ce groupe se subdivise en deux subclusters à un niveau de 71 % du coefficient de Jaccard.

- Le subcluster 1 rassemble les isolats 06-02-OG, 14-01-SB et 46-02-EA.
- Le subcluster 2 regroupe les isolats 10-02-LK, 16-02-OS, 46-01-AK, 13-01-HN, 48-02-BH, 13-02-MN, 13-01-BS, 46-01-EMB.

Le "groupe II" renferme seulement l'isolat 46-01-HB de l'Ouest et la souche CP63.

### III.6.4. Discussion

L'analyse du gène *nodC*, par utilisation de la PCR-RFLP, a été employée dans le but de montrer une éventuelle diversité entre les isolats en les comparant avec les souches de référence de la même espèce de *Rhizobium* isolée du pois chiche sur la base d'un gène symbiotique.

Selon Laguerre *et al.* (2001), qui ont utilisé les souches du pois chiche *Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium mediterraneum* parmi d'autres espèces de *Rhizobium* (83 souches représentant les espèces de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*), les profils de restriction du gène *nodC*, obtenus en utilisant six enzymes, de ces deux souches étaient généralement semblables.

Dans notre cas, une différence entre les profils de restriction des isolats a été observée en utilisant trois enzymes, regroupant les isolats géographiquement éloignés 06-02-OG pour l'Est, 10-02-LK, 16-02-OS pour le centre et 14-01-SB, 46-02-EA,

46-01-AK, 13-01-HN, 48-02-BH, 13-02-MN, 13-01-BS, 46-01-EMB pour l'Ouest avec la souche *Mesorhizobium ciceri* (ATCC51585). Néanmoins, les isolats de certains sites ont montré une combinaison de profils uniques, différente de celle des autres sites (06-02-OG, 14-01-SB et 46-02-EA; 46-01-HB) ces isolats pourraient représenter une autre espèce de *Mesorhizobium* infectant le pois chiche. Par ailleurs, les isolats 06-02-OG, 14-01-SB qui se sont regroupés avec la souche type de *Mesorhizobium ciceri* par les caractères phénotypique se sont retrouvés séparés de cette souche par le caractère génétique.

En conclusion, la PCR-RFLP du gène *nodC* a permis la différenciation au niveau intraspécifique entre les souches. Les isolats représentant des régions différentes se sont trouvés dans le même groupe et les isolats de la même origine géographique sont répartis dans trois différents clusters. Ce résultat corrobore les autres études sur le *Rhizobium* du pois chiche (Nour *et al.*, 1995 ; Maâtallah *et al.*, 2002).

Par ailleurs, Aouani *et al.* (2001) ont rapporté que le pois chiche peut être nodulé par le *Sinorhizobium medicae* mais ces nodosités sont inefficaces. Maâtallah *et al.* (2002) ont aussi trouvé des isolats appartenant au genre *Sinorhizobium* dans les nodules de pois chiche. En comparant les profils établis par Laguerre *et al.* (2001) de la RFLP du *nodC* des souches appartenant au genre *Sinorhizobium* et les profils de nos souches, aucune ressemblance n'a été détectée. Ce qui exclurait, peut être, la présence des *Sinorhizobium* dans notre collection.



## CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons cherché d'une part, à déterminer la diversité des isolats de *Rhizobium* capables de noduler le pois chiche provenant de régions éloignées d'Algérie et d'autres part, à trouver des corrélations possibles avec la répartition géographique et écologique des isolats, tout en indiquant les isolats montrant un intérêt agronomique. Les différentes techniques utilisées ont présenté des pouvoirs discriminants variés.

La caractérisation phénologique des isolats a montré une grande hétérogénéité des isolats d'origines géographiques différentes. En effet, sept groupes phénologiques ont été observés. Comme la majorité des *Rhizobium* infectant le pois chiche (Nour *et al.*, 1994a; Maâtallah *et al.* 2002), les isolats ont montré des temps de génération différents (croissance rapide, intermédiaire et lente), acidification du milieu de culture, une tolérance aux températures extrêmes pour certains isolats, tolérance au milieu alcalin, tolérance aux différentes concentrations de sel (jusqu'à 1,5% de NaCl), assimilation d'une grande variété de sucre et une résistance aux chloramphénicol et l'acide nalidixique (antibiotique).

Cependant, les isolats 24-01-TM, 24-01-AM, 06-02-OG, 42-02-TP, 16-02-OS, 16-01-BK, 46-01-AL, 46-01-AK, 46-01-AK1, 48-02-BH, 14-01-SB ont montré des caractères intéressants, tels que leur capacité à supporter les milieux dont les pH sont très bas (3,5), ainsi que leur aptitude à tolérer des concentrations élevées en métaux lourds dans le milieu de culture.

La caractérisation sérologique n'a pas pu mettre en évidence une grande variabilité existante dans les sites antigéniques entre les isolats. Cependant, malgré l'utilisation de la

sérologie dans plusieurs études de caractérisation pour différencier les souches de *Rhizobium*, le classement de nos vingt cinq isolats et souches en trois sérogroupes seulement peut être expliqué soit par la parenté antigénique des isolats, ou bien par le manque de spécificité des sera polyclonaux.

L'analyse de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique des isolats a laissé apparaître une grande variabilité dans la fixation ainsi que la nodulation. En dépit de la diversité phénologique montrée par les isolats, ainsi que leur sensibilité au milieu extrême, les isolats 21-02-EH, 06-02-OG, 16-02-OS, 10-02-LK, 46-02-EA, 46-01-EMB et 48-02-BH se sont montrés plus efficaces. L'amélioration de la fixation de l'azote du pois chiche par l'introduction de ces isolats constitue une perspective intéressante.

La classification des rhizobia utilise un ensemble de critères généraux (GC%, hybridation ADN : ADN, ARN 16S) (Vandamme *et al.*, 1996) mais ne prend pas en compte les propriétés symbiotiques généralement dissociées de la taxonomie (Graham *et al.*, 1991). Cependant, l'intérêt agronomique et écologique des rhizobia repose essentiellement sur leur propriété symbiotique, d'où l'importance d'avoir des éléments permettant d'apprécier la diversité des souches sur la base de ce critère. La caractérisation moléculaire sur la base d'un gène symbiotique est une caractérisation symbiotique indirecte, qui dans notre cas a pu différencier les isolats testés en trois groupes. Cette différence implique une diversité intraspécifique entre les différents isolats et avec les souches références, mais le nombre limité des isolats et enzymes utilisés n'a pas permis leur identification.

Notre travail a permis de mettre en évidence les points suivants:

- La méthode d'authentification la plus efficace dans le cas des *Rhizobium* nodulant le pois chiche est l'utilisation de substrats solides (vermiculite, sable de rivière stérile, sol stérile).
- La caractérisation sérologique en utilisant les sera polyclonaux a montré un faible pouvoir de discrimination.
- La caractérisation phénologique, à elle seule, ne peut pas permettre l'identification des *Rhizobium*, étant donné les différents résultats obtenus par les tests physiologiques. Par ailleurs, les similitudes des caractères phénologiques ayant pu regrouper les isolats ont été infirmées par la caractérisation moléculaire.
- Les isolats adaptés aux conditions édaphoclimatiques de l'Algérie, ayants montrés un potentiel de fixation intéressant sont : 21-02-EH, 06-02-OG, 16-02-OS, 10-02-LK, 46-02-EA, 46-01-EMB et 48-02-BH, pourraient servir à la préparation des inoculum commerciaux et présenter de bon isolats pour une éventuelle inoculation.
- L'hétérogénéité des isolats de *Rhizobium* isolés du pois chiche et leur répartition en groupes sur la base de la caractérisation génotypique et phénotypique, sans aucune relation avec leur origine géographique.
- L'ensemble des données obtenues, comparées à celles des souches de références, montrent la proximité de nos isolats plus particulièrement avec l'espèce *Mesorhizobium ciceri*.

Un tel travail ouvre de multiples perspectives. Il serait intéressant d'intégrer un nombre plus important d'isolats pour une collection plus grande et plus représentative des différentes zones où le pois chiche est cultivé. L'utilisation de plusieurs variétés de pois chiche pour mettre en évidence la meilleure symbiose avec différents isolats. Par ailleurs, il serait utile de compléter la caractérisation des isolats par l'utilisation de méthodes d'identification tels que les protéines totaux, homologies ADN/ADN et la PCR-RFLP du 16S-IGS.



## Références bibliographiques

- Amarger, N., Bours, M., Revoy, F., Allard, M. R. et Laguerre, G. 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil*. 161 : 147-156.
- Amarger, N., Laguerre G. 1995. Caractérisation des *Rhizobium*. Les Colloques, n° 77. Ed. INRA, Paris. pp. 193-204.
- Amarger, N. Macheret, V. et Laguerre G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 : 996-1006.
- Anonyme. 1987. La lentille et le pois chiche pour une conduite mécanisé. I.T.G.C., 31p.
- Anonyme. 1997. Polycope sur les analyses de routines internationales des sols et des végétaux : Normes AFNOR. Ed Université de Minia. 57 p.
- Aouani, M. E., Mhamdi, R., Jebara, M. et Amarger, N. 2001. Characterisation of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie*. 21 : 577-581.
- Arsac, J.F. et Cleyet-Marel, J.C. 1986. Serological and ecological studies of *Rhizobium* spp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence and ELISA technique : Competitive ability for nodule formation between *Rhizobium* strains. *Plant and Soil*. 94 : 411-423.
- Bacha, F. 2002. Etude de l'effet du stress hydrique sur la nutrition azotée du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse de magistère. INA. El-Harrach. 95 p.
- Balandreau, J., Dommergues, Y. 1971. Mesure in situ de l'activitéé nitrogénase. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 273 : 2020-2023.

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001. Taxonomic outline of the Prokaryote Genera. Second edition. ed. Garrity, George, M., Springer-Verlag, New York, 2001.(<http://www.cme.msu.edu/bergeys/> page 7)
- Biossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. et Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* : current status and need for revision. *Agronomie*. 20 : 51-63.
- Bordeleau, L. M. et prévost, D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*. 161 : 115-125.
- Bromfield, E. S. S. et Kumar Rao, J. V. D. K. 1983. Studies on fast and slow *Rhizobium* spp. nodulating *Cajanus cajan* and *Cicer arietinum*. *Annals of Applied Biology*. 102 : 485-493.
- Broughton, W. J. Jabbouri, S. et Perret, X. 2000. Keys to Symbiotic Harmony. *J. Bacteriol.* 182 : 5641-5652.
- Broughton, W. J. 2003. Roses by Other Names: Taxonomy of the Rhizobiaceae. *Journal of Bacteriology*. 185 : 2975-2979.
- Broughton, W. J., Samvey, U., Pankhurst, C. E., Schneider, G. M et Vance, C. P. 1984. Ecology and microbiology of symbiotic diazotrophs. In *Advances in Nitrogen Fixation research*. Ed. C. Veeger and WE Newton (s). Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, The Netherlands. pp. 279-285.
- Cadahia, m, E., Leyva, A. and Ruiz-Argüeso, T. 1986. Indigenous plasmids and cultural characteristics of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum L.*). *Arch.Microbiol.* 146 : 239 –244.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K. et Quinto, C. 1998 Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium nodulation* signals. *Plant Physiol.* 116: 871-877.
- Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T. L., Sanchez, F., Quinto C., Feijo, J. A., Kunkel, J. G. **et Helper P. K. 2000.** Ion Changes in Legume **Root** Hairs Responding to Nod Factors. *Plant Physiol.* 123 : 443-452.
- Chakrabarti, S. K., Mishra, A. H. et Chakrabarty, P. K. 1986. Dna homologies studies of rhizobia from *Cicer arietinum L.* *Can. J. Microbiol.* 32 : 524-527 .
- Chen, Z. X.m., Han, G. H., et Li, J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. *Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 : 392-397.
- Chergui, M., Dahmane, AB., et Ghram, A. 1996. Study of symbiotic, serological and antibiotic resistance characteristics of different *Rhizobium ciceri* strains. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 73 : 185-91.
- Cigales-Rivero, M. R. 1984. Apport des techniques immunochimiques à la connaissance de l'écologie de *Rhizobium phaseoli*. These de doctorat. ENSA de Montpellier. 142 p.
- Cleyet-Marel J-C., Rome, S., Salducci, X. et Wery, J. 1996. Importance des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes : exemple des relations *Rhizobium/légumineuses*. *Acta bot. Gallica.* 143 : 521-529.
- de Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.

- D., Dreyfus B. L., Kersters K., Gillis M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia. Emendation of genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 : 715-733.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 48 : 1277-1290.
- Dénarié J. Debellé, F. et Promé J-C. 1996 *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65 : 503-535.
- Dobert, R. C., Breil, B. T., Triplett, E. W. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationships to those of other nodulating bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 7 : 564-572.
- Downie, J.A. et Walker, S.A. 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2 : 483-489.
- Dreyfus B. L., Garcia J. L., Gillis, M. 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.
- Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, L., Maestrojuan, G., qestrojuqn, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, MD., et Gillis, M. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 : 461-473.
- Earl , C. D., Ronson, C. W. et Ausubel , F. M. 1987 . Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* fixA, fixB, fixB, fixC, fixX, genes J. Bacteriol., 169: 1127 – 1136.**
- Elsheikh, E. A. E. et Wood, M. 1999. Responce of chickea and soybean rhizobia to salt : influence of carbon source, temperature and pH. *Soil Biol. Biochem.* 21. 883-887.
- England, L. S., Lee, H., et Trevors, J. T., 1993. Bacterial survival in soil : effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 25 : 525-531.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. et Perret X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387 : 394-401.
- Fulchieri, M. M., Estrella, M. J. et Iglesias, A. A. 2001. Caractérisation of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Anatonie van Leeuwenhoek.* 79 : 119-125.
- Gaur, Y. D. et Sen, A. N. 1979. Cross inoculation group specificity in Cicer-Rhizobium symbiosis. *New Phytol.* 83 : 745-754.
- Geurts, R. et Bisseling, T. 2002. *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling .*The Plant Cell.* 14 : 239-249.
- Gouffi, K. N. Pica, V. Pichereau, and C. Blanco. 1999. Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 1491-1500
- Graham, P. H., Sadowsky, M., Keyse, J., Barnet, H. H., Bradley, Y. M., Cooper, R. S.,

- Ley, J. E., Jarvis, D. J., Roslycky, B. D. W., Strijdom, F. B., B.W., Young, J. P. W. 1991. Proposed Minimal Standards for the description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 41 : 582-587.
- Hadri, A.-E., Spaink, H.P., Bisseling, T. et Brewin, N. J. 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In *The Rhizobiaceae*. Ed. P. Spaink, A.Kondorosi and P.J.J. Hooykaas. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands). pp. 347–360.
- Haukka, K., Lindström K., Young, J. P. W. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 419-426.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, HP., van Kammen, A. et Bisseling, T. 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* 105 : 787-797
- Heynen, C. E., van Elsas, J. D., et Kuikmam, P.J. 1988. Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil : the effect of bentonite clay on predation by protozoa. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 20 : 483-488
- Hungria, M., Chueire, L. M., R. G. et Megias M. 2001. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biol. Biochem.* 33 : 1349-1361.
- Irisarri, P., Milnitsky, F., Monsa, J., et Bedmar, E.J. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and soil* 180 : 39-47.
- Jarvis, B. D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J. J. 1982. *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 378-380.
- Jarvis, B. D.W., Van Berkum P. Chen, W. X., Nour S. M. Fermadez, M. P. Cleyet-Marel, J. C. et Gillis M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, ***Rhizobium*** *mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895-898.
- Johnston, A.W.D. 1989. The symbiosis between rhizobium and legumes. In *Genetics of bacterial diversity*. Ed. Hopwood and Charter. Academic Press. pp. 393-414.
- Jordan, D. C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 136-139.
- Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobiaceae. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed. N. R. Kreig and J. G. Holt. Wilkins Co., Baltimore, Md. pp. 234-244.
- Kingsley M. T. and Bohlool B. B. 1983. Characterization of *Rhizobium* Sp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence, immunodiffusion and intrinsic antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* 29 : 518-526.
- Kondorosi A. 1991. Overview on genetics of Nodule induction : Factors controlling nodule induction By *Rhizobium meliloti*. In *Advances in Molecular genetics plant-microbe interaction I*. Ed. Hauke Hennecke Desh Pal S. Verma (Kluwer academic Publishers). pp. 111-115.
- Kondorosi A. Kiss G. B. and Dushal. 1984. Plasmid governing symbiotic nitrogen

- fixation. In Current developments in Biological Nitrogen fixation. Ed. N. S. Subba Rao. HIB, New Delhi pp. 135-171.
- Rupela, O.P., et Kumar Rao, J.V.D.K. 1987. Effets of drought, temperature and salinity on symbiotic nitrogen fixation in legumes, with emphasis on chickpea and pigeonpea to Abiotic stresses, Proc. Consultants Workshop, Patancheru, India, December 1984, Patancheru, India : Icrisat.
- Kyei-Boahen, S. Slinkard, S. A. et Walley, F. L. 2002. Evaluation of Rhizobial Inoculation Methods for Chickpea. *Agronomy Journal* . 94 : 851-859.
- Laguerre G., Allard M-R., Revoy F. et Amarguer N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 56-63.
- Laguerre G., Van Berkum P., Aarger N. et Prévost D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 4748-4758.
- Laguerre, G., Nour, S., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. 2001. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology.* 147: 981-993.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. et Denarie, J. 1990. Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344 :781–784.
- Lindemann, W. C. et Ham, G.E. 1979. Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperature. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43 : 1134-1137.
- Lindström, K., Paulin, L., Roos, C., Suominen, L. 1995. Nodulation genes of *Rhizobium galegae*. In *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Proc. of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation. Ed I. A. Tikhonovitch, N. A. Provorov, V. I. Romanov & W. E. Nexton. Dordrecht: Kluwer. pp. 365-370.
- Lindström, K., Terefework, W., Suominen, L., et Lortet, G. 2002. Signalling and development of *Rhizobium*–*Legume* symbioses. *Biology and Environment.* 102 : 61-64.
- Long S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell.* 56 : 203-214.
- Long S.R. 2001.** Genes and Signals in the *Rhizobium*–*Legume* Symbiosis. *Plant Physiol.* 125 : 69-72.
- Maâtallah, J., Berraho, E., Muñoz, S., Sanjuan, J., et Luch, C. 2002. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 93 : 531-540.
- Martinez, E., Romero, D. et Palacios R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9 : 59–93.
- Martinez, E., Romero, 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil*; 161 :11-20 .
- Martinez, E., Romero, et Caballero-Mellado J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. CRIT REV. Plant Sci. 15 : 113-140.**

**May, S. N. et Bohool, B. B. 1983. Competition among *Rhizobium leguminosarum* stains for nodulation of lentils (*Lens esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 960-965.**

Meyer, A., Decana, J., Leclere. 1999. Cours de microbiologie générale Nouveau programme. Ed. Doin. Paris. pp. 331-336.

Moaward, H. and Bohool, B. B. 1984. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena Leucocaphala* in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 5-9.

Monza, J., Fabiano, E., Arias, A. 1992. Caractérisation of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24 : 241-247.

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.

Mulligan J.T. et Long, S.R. 1985. Indication of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD PNAS 82 : 6609-6613.

Nour, S. M., Cleyet-Marel, J-C., Beck, D., Efosse, A. et Fernandez, M.p. 1994a. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum L.*). *can. j. microbiol.* 40 : 345-354 .

Nour, S. M., Fernandez, M., Normand, P. et Cleyet-Marel, J. C. 1994b. *Rhizobium Ciceri* sp. nov. consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum L.*). *int. J. syst. bacteriol.* 44 : 511-522.

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

Ohwada, T. Sasaki, Y., Koike, H., Igawa, K., et Sato, T. 1998. Correlation between NaCl Sensitivity of *Rhizobium* Bacteria and Ineffective Nodulation of Leguminous. *Plants.Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 : 2086-2090.

Ounane, S. M. 2004. Influence du stress hydrique et thermique sur la nutrition azotée chez le pois chiche. Thèse de doctorat. INA. El-Harrach. 95 p.

Ozawa, T. 1988. Competitive nodulation ability of *Bradyrhizobium japonicum* strains incubated in soil. *Soil Biol. Biochem.* 20 : 315-318.

Perret X. Staehelin C. et Broughton W. J. 2000 Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64 : 180-201.

Peuppke S.G., and Broughton, W. J. 1999. *Rhizobium* sp. NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host-ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 :293-318.

Rinaudo, G., Orenge, S., Fernandez, M., Meugnie, R. H., Bardin, R. 1991. DNA homologies among members of genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 : 607-610.

Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J.-C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 :972-980.

Rother J. A. W. Millbank and I. Thornoton. 1983. Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in grasslands on soils contaminated with cadmium, lead and zinc.

- J. Soil Sci. 34 : 127-136.
- Rupela, O. P. et Beck, D. P. 1990. Prospects for optimizing biological nitrogen fixation in chickpea. In Chickpea in the nineties : proceedings of the second international workshop on chickpea improvement. ICRISAT Center, Patancheru, India. pp. 13-25.
- Rupela, O. P. et Saxena, M. C. 1987. Nodulation and Nitrogen fixation in Chickpea. In the chickpea. Ed. M. C. Saxena and K. B. Singh. ICADA, pp 191-206.
- Sahgal, M. et Johri, B. N. 2003. The changing face of rhizobial systematics. Current science. 84 : 43-48.
- Santamaria, M., Corzo, J., Leon-Barrios, M., et Gutierrez-Navarro, A. M. 1997. Characterisation and differentiation of indigenous rhizobia isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. Plant and Soil. 190 : 143-152.
- Scholla, M. H., Elkan, G. H. 1984. Rhizobium fredii sp.nov. a fast growing species that effectively nodulates soybeans, Int. J. Syst. Bacteriol. 34 : 484-486.
- Schultze, M., Kondorosi, A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. Annual Review of Genetics. 32 : 33-57.
- Somasegaran, P., Hoben, H. 1985. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Ed. university of Hawaii Niftal project and MIRCEN. United States Agency for International Development (USAID). pp. 367.
- Somasegaran, P., Hoben, H., et Gurgun, V. 1988. effect of inoculation rate, rhizobial strain competition. And nitrogen fixation in chickpea. Agron. J. 80 : 68-73.
- Soussi, M., Liuch, C. et Ocaña, A. 1999. Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. Journal of Experimental Botany. 50 : 1701-1708.
- Spaink, H. P., Aarts A., Stacey G., Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J. et Kennedy E. P. 1992. Detection and separation of Rhizobium and Bradyrhizobium Nod metabolites using thin-layer chromatography. Mol. Plant-Microbe interact. 5 : 72-80.
- Spaink, H. P., Wijffes, A. H. M., van der Drift, K. M. G. M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J. E. et Lugtenberg, B. J. J. 1994. Mol. Microbiol. 13, 821-831.
- Spaink, H. P., Bloemberg G. V., Van Brussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J., Van der Drift K. M. G. M., Haverkamp J. et Thomas-Oates J. E. 1995. Host specificity of Rhizobium leguminosarum is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. Mol. Plant-Microbe interact. 8 : 155-164.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., et Ronson, C. W. 1995. Nodulating strains of Rhizobium loti arise through chromosomal and symbiotic gene transfer in the environment. Proc. Natl. Acad. Sci. 92 : 8995-8999.
- Sullivan, J. T., Eardly, B. D., van Berkum, P. et Ronson, C. W. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of Lotus corniculatus. Appl. Microbiol. 62 : 2818-2825.
- Sullivan, J. T., et Ronson, C. W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5145-5149.
- 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 : 2214-2220.
- Tajima, S., et Kouchi, H. 1997. Metabolism and Compartmentation of Carbon and Nitrogen in Legume Nodules. In *Plant-plant interactions II*. Ed. Gary Stacey & Noel T. Keen, U. S. A., pp. 27-59.
- Ohwada, T., Sasaki, Y. Koike, H., Igawa, K. et Sato, T. 1998. Correlation between NaCl sensitivity of Rhizobium bacteria and ineffective nodulation of leguminous plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 : 2086-2090.
- Ternynk, T., Avrameas, S. 1985. Techniques immunoenzymatiques. Société Française d'immunologie. Ed. INSERM. pp. 46-48.
- Tighe SW; de Lajudie, P. Dipietro, K. Lindstrom, K. Nick, G. et Jarvis B.D.W. 2000. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of Agrobacterium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium and Sinorhizobium species using the Sherlock Microbial Identification System. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 : 787-801.
- Turner S.L. Et Young J.P.W. 2000. The Glutamine Synthetases of Rhizobium : Phylogenetics and Evolutionary Implications. *Molecular Biology and Evolution* .17 : 309-319.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., Matsuguchi, T. 1995. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. *J. Bacteriol.* 177 : 468-472.
- U.S. Salinity Laboratory Staff. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S.D.A. Handbook N° 60. 160p.
- van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindström, K., et Eardly, B. D. 2003. Discordant phylogenies with the rrn loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* 185 : 2988-2998.
- van Rhijn, P., et Vanderleyden, J. 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59 :124–142.
- Vandamme, P., Pot B., Gillis, M., Devos, P., Kersters, K. et Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Review.* 60 : 407-438.
- Velagaleti R.R. And S. Marsh. 1989. Influence of host cultivars and Bradyrhizobium strains on the growth and symbiotic performance of soybean under salt stress. *Plant Soil* 119 : 133.
- Velazquez E., Cruz-Sanchez J.M., Mateos P.F., et Martinez- Molina, E. 1998. Analysis of Stable Low-Molecular-Weight RNA Profiles of Members of the Family Rhizobiaceae. *Appl Environ Microbiol.* 64 : 1555-1559.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. I. b. p. Handbook N°15, Oxford : Blackuell scientific publications. pp.164.
- Vlassak, K M., et Vanderleyden, j. 1997. Factors Influencing Nodule Occupancy by Inoculant Rhizobia. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 16 :163-229 .
- Wais R.J., Keating D.H. Et Long S.R. 2002. Structure- Function Analysis of Nod Factor-Induced Root Hair Calcium Spiking in Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Physiology.* 129 :211-224.**
- Ward, D. M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Current opinions in*

- microbiology. 1 : 271-277.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., et Trüper, H. G. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 : 463–464 .
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51 : 221-271.
- Wright, S. F., Foster, J. G., Bennett, O. L. 1986. Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology.* 52 : 119-123 .
- Yadav O. P. and U.C. Shukla.** 1983. Effect of zinc on nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Agric. Sci.* 101 : 559-563.
- Yap, W. H., Zhang, Z. et Wang, Y. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena*. *J. Bacteriol.* 181 : 5201-5209.
- 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 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 89-103.
- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *Biological Nitrogen Fixation*. Ed. Stacey, R. H. Burris & H. J. Evans. Chapman & Hall, New York. pp. 43-86.
- Young, J. P. W., Haukka, K. E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133 : 87-94.
- Zakhia, F., de Lajudie, P., 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie.* 21 : 569-576
- Zahran, H. H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63 : 968-989.
- Zhang X.X., Turner S.L., Gue X.W., Yang Y.J., Debellé F., Yang G.P., Dénarié J., Young J.W.P., et Li F.D. 2000. The Common nodulation genes of *astragalus sinicus* *Rhizobia* are conserved despite chromosomal diversity. *Applied and environment microbiology.* 66:2988-2995.



---

# Annexes

## Annexe 1 : Milieux utilisés.

### 1. Milieu d'isolement :

Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) :

NaCl	0,1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Extrait de levure	0,5 g
Mannitol	10 g
Agar	15 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

- Le pH est Ajusté à 6,8.
- Stérilisation pendant 20 min à 120°C.

À cause des contaminants, l'absence de milieu sélectif rend l'obtention de souche pure très difficile. Pour cela, 1 ml d'une solution de rouge Congo à 2,5% (poids/volume) est

ajouté à 1000 ml de milieu YMA (les *Rhizobium* absorbent faiblement le Rouge Congo par rapport à d'autres bactéries) (Vincent, 1970). Le milieu YMB (Yeast Mannitol Bouillon) a la même composition que le YMA, mais sans agar.

## **2. Milieu d'authentification :**

Le milieu utilisé pour le test de nodulation est le milieu Farhaeus (Vincent, 1970), dont la composition est la suivante :

- Macroéléments :

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,12 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

- Microéléments :

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnSO <sub>4</sub>	2,08 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,08 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,11 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

- Préparation du fer citraté :

Fe-citraté	0,05 g
Eau distillée	10 ml

1ml de la solution des microéléments et 1ml du fer citraté sont prélevés et rajoutés à la solution des macroéléments, puis ajustés à pH 6,8. Pour un milieu semi solide, on ajoute 6 g d'agar et on stérilise le milieu pendant 20 min à 120°C.

## **3. Milieu utilisé pour la dégradation des sucres :**

Le milieu utilisé pour la dégradation des sucres est le milieu cité par Vincent (1970), dont la composition est la suivante :

- Macroéléments :

$K_2HPO_4$	1 g
$KH_2PO_4$	1 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,01 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$KNO_3$	0,8 g
Source de Carbone	10 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

- Microéléments :

$NaMoO_4$	0,05 mg
$CuCl_2 \cdot H_2O$	0,05 mg
$ZnCl_2$	0,045 mg
$H_3BO_3$	0,06 mg
$MnSO_4$	0,05 mg
Eau distillée q.s.p	1000 ml

#### 4. Milieu minimum :

Le milieu minimum (Nour *et al.*, 1994a) utilisé pour la caractérisation physiologique est le suivant :

$K_2HPO_4$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
Mannitol	10 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

## Annexe 2 : Tampon utilisés.

A. Le tampon PBS pH 7.4 :

NaCl	8,0g
$KH_2PO_4$	0,2g
KCl	0,2g
$NaN_3$	0,2g

B. Le tampon PBS-Tween :

Le tampon PBS est additionné de Tween 20 à raison de 0,5 ml pour 1 litre.

C. Conjugué :

Anticorps chèvre anti IgG (H+L) lapin couplés à la peroxydase (Laboratoires SANOFI PASTEUR)

D. Substrat utilisé en test ELISA :

3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (TMB).

La solution du TMB est diluée au 1/11<sup>ème</sup> dans du tampon du substrat contenant 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du DMSO.

C. Solution d'arrêt du test ELISA :

Solution d'acide Chlorhydrique 3N.

D. Tampon TBE :

Tris base	10,8 g
Acide Borique	5,5 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	4,02 ml
Eau distillée qsp	1000 ml

EDTA 0.5 M :

EDTA	186,1 g
Eau distillée	800 ml

Ajuster à pH 8 avec NaOH 10N

## **Annexe 3 : Caractéristiques du matériel végétal utilisé**

**Tableau 1 : Principales caractéristiques de la variété de pois chiche utilisée.**

Variété	Origine	Caractères importants	Valeur culinaire
ILC 3279	Originnaire de la Russie, introduite de la Syrie (ICARDA)	-Précocité : tardive. -Port : très érigé. -Vigueur : très bonne. -Nombre de graines par gousse : 1 à 2. - Poids de 100 graines : 32.5 g	Assez bonne

Source : Anonyme 1987.

## **Annexe 4 : Résultats des différentes caractérisations.**

---

Isolats	Température (°C)					Salinité NaCl (g/100ml)					pH			
	0	15	20	27	42	0,25	0,5	1	1,5	2,5	5	6,0	8	10
21-02-EH			+	+	+	+	+	+	-			-	+	+
21-02-GR	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
24-02-PM		-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
26-02-GR	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
08-02-GR	-	-	+	-	-	+	+	+		-	+		+	+
42-02-TE	-		+	+	+	+	+	+		+	+		+	+
10-02-LR			+			+	+	+	-			-	+	+
13-02-GR	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
15-02-BK	-		+	+	-	+	+	+		+	+		+	+
45-02-AL	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
48-02-AK			+			+	+	+	-	+	+	-	+	+
41-02-IT	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
45-02-EA	-	-	+	+	-	+	+	+		-	+		+	+
48-02-AK	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
45-02-EA	-	-	+	-	-	+	+	+		-	-		+	+
48-02-DVD	-		+			+	+	+	-			-	+	+
13-02-BE	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
13-02-GR			+			+	+	+	-		+	-	+	+
41-02-IT	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
13-02-GR	-	-	+	-	-	+	+	+		-	+		+	+
14-02-SD	-		+	+		+	+	+	-	+	+	-	+	+
14-02-GR	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
ATCC31207	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
ATCC388E	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
CP6E			+	+		+	-	+	+			+	+	+

Tableau 1 : Les caractères physiologiques

**Thème Essai de caractérisation de quelques isolats de Rhizobium nodulant le pois chiche (Cicer arietinum L.)**

Isolate	Méno-oligosaccharides						Disaccharides et Trisaccharides						Polysac				GFD	
	glu	ara	mal	gal	man	rpo	gl	sucl	lact	mal	cel	fruc	act	ché	sucl	gluc		mann
2407-101	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2407-102	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
2407-103	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
45-03-104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-40-105	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
1-10-106	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
1-40-107	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
1-40-108	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
1-40-109	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-110	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-111	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-112	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-113	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-114	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-115	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-116	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-117	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-118	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-119	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-120	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-121	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-122	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-123	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-124	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-125	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-126	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-127	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-128	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-129	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-130	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-131	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-132	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-133	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-134	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-135	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-136	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-137	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-138	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-139	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-140	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-141	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-142	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-143	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-144	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-145	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-146	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-147	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-148	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-149	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-150	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-151	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-152	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-153	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-154	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-155	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-156	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-157	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-158	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-159	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-160	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-161	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-162	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-163	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-164	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-165	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-166	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-167	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-168	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-169	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-170	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-171	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-172	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-173	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-174	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-175	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-176	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-177	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-178	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-179	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-180	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-181	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-182	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-183	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-184	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-185	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-186	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-187	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-188	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-189	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-190	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-191	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-192	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-193	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-194	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-195	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-196	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-197	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-198	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-199	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
45-03-200	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

**Tableau 2 : Dégradation des différents sucres par les isolats :**

**Tableau 3 : Résistance aux antibiotiques exprimée par diamètre d'inhibition :**

Isolats	Acide nal	Chlora	Erytro	Kanami	Polymi	Pellici	Spiram
25-02-KH	-	-	-	32	-	-	-
21-02-EH	-	28	-	38	-	-	-
19-01-AK	28	14	-	28	-	-	-
24-01-TM	28	-	-	22	-	-	-
24-01-AM	28	-	-	26	-	-	-
06-02-OR	-	-	-	36	-	-	-
42-02-TP	28	10	-	30	-	-	-
10-02-LK	-	-	-	46	-	-	-
16-02-OS	-	-	-	46	-	-	-
16-01-BK	28	14	-	28	-	-	-
46-01-AL	40	-	-	22	-	-	-
46-01-AK	-	-	-	52	-	-	-
46-01-HB	-	-	-	50	10	-	-
46-02-EA	-	-	-	46	-	-	-
46-01-AK1	-	12	-	34	-	-	-
46-01-EMA	-	30	24	30	10	-	24
46-01-EMB	-	-	-	46	-	46	-
13-01-BS	-	-	-	50	14	-	-
13-02-MN	-	-	-	34	-	-	-
48-02-BH	-	10	-	40	-	28	-
13-01-HN	-	12	-	40	-	-	-
14-01-SB	-	-	-	44	-	-	-
14-01-RA	-	20	-	28	-	-	-
ATCC51585	-	14	-	38	-	-	-
ATCC51586	-	28	18	30	-	-	26
CP63	-	26	-	34	16	-	-

Tableau 4 : Résistance aux métaux lourds :

**Thème Essai de caractérisation de quelques isolats de Rhizobium nodulant le pois chiche (Cicer arietinum L.)**

Isolats	Hg	Co	Cu	Ni	Pb	Zn	cd
21-02-EH	-	-	-	-	+	-	+
19-01-AK	+	+	-	-	+	+	+
24-01-TM	+	+	-	-	+	+	+
24-01-AM	+	+	-	-	+	+	+
06-02-OR	-	-	-	-	+	-	+
42-02-TP	+	+	-	-	+	+	+
10-02-LK	-	-	-	-	+	-	-
16-02-OS	+	-	-	-	+	-	+
16-01-BK	+	+	-	-	+	+	+
46-01-AL	+	+	-	-	+	+	+
46-01-AK	-	-	-	-	+	-	+
46-01-HB	-	-	-	-	+	-	+
46-02-EA	-	-	-	-	-	-	-
46-01-AK1	-	-	-	-	+	-	+
46-01-EMA	-	-	-	-	+	-	+
46-01-EMB	-	-	-	-	+	-	+
13-01-BS	-	-	-	-	+	-	-
13-02-MN	-	-	-	-	+	-	+
48-02-BH	+	-	-	-	+	-	+
13-01-HN	-	-	-	-	+	-	+
14-01-SB	+	-	-	-	+	-	+
14-01-RA	-	-	-	-	+	-	-
ATCC51585	+	-	-	-	+	-	+
ATCC51586	-	-	-	-	+	-	+
CP63	-	-	-	-	+	-	+

## Annexe 5 : Analyse de la variance.

Tableau 1 : Analyse de la variance des moyennes de l'A.R.A. des plants de pois chiche.

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	233.91	74	3.16				
VAR.FACTEUR1	225.42	24	9.39	55.30	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	8.49	50	0.17	0.41		0.41	19.5%

Isolats	Groupes homogènes									
40-02-EA	A									
06-02-OG		B								
48-02-BH		B								
CPE3		B	C							
46-01-EMB			C	D						
ATCC 51506				D	E					
16-02-OS					E	F				
21-02-EH					E	F				
24-01-TM						F	G			
ATCC 51585						F	G			
10-02-LK						F	G	H		
16-01-DK						F	G	H		
42-02-TP						F	G	H		
14-01-SB							G	H	I	
46-01-AK							G	H	I	
13-01-HN							G	H	I	
46-01-AK1							G	H	I	
46-01-AL								H	I	J
46-01-HB									I	J
24-01-AM									I	J
19-01-AK									I	J
14-01-RA									I	J
13-02-MN										J
13-01-BB										J
46-01-EMA										J

**Tableau 2 :** Classement des isolats par rapport à la quantité d'azote fixé selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5%.

**Tableau 3 :** Analyse de la variance des moyennes du nombre de nodosités par plant.

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBAE.T.	C.V.
VAR.TOTALE	6006.48	74	81.17			
VAR.FACTEUR1	4442.48	24	185.10	5.92	0.0000	
VAR.RESIDUELLE 1	1564.00	50	31.28			5.59 33.8%

Isolats	Groupes homogènes				
14-01-RA	A				
46-01-AK1		B			
16-02-OS		B	C		
ATCC 51585		B	C	D	
14-01-SB		B	C	D	E
46-01-EMA		B	C	D	E
16-01-BK		B	C	D	E
46-01-AL		B	C	D	E
10-02-LK		B	C	D	E
48-02-BH		B	C	D	E
13-01-BS		B	C	D	E
24-01-AM		B	C	D	E
24-01-TM		B	C	D	E
06-02-OG		B	C	D	E
46-01-HB		B	C	D	E
19-01-AK		B	C	D	E
13-01-HN		B	C	D	E
13-02-MN		B	C	D	E
46-01-AK		B	C	D	E
46-02-EA			C	D	E
42-02-TP			C	D	E
21-02-EH			C	D	E
46-01-EMB			C	D	E
ATCC 51586				D	E
CP63					E

**Tableau 4 :** Classement des isolats par rapport au nombre de nodosité selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5%

**Tableau 5 :** Analyse de la variance des moyennes du poids frais des nodosités des plants de pois chiche inoculés.

	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	7.97	74	0.11				
VAR.FACTEUR1	5.91	24	0.25	5.97	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 1	2.06	50	0.04			0.20	40.8%

Isolats	Groupes homogènes			
	A	B	C	D
16-02-DS	A			
46-01-AK1	A			
ATCC 51585	A	B		
48-02-BH	A	B	C	
14-01-RA	A	B	C	
46-01-EMA	A	B	C	
46-01-HB	A	B	C	
14-01-SB	A	B	C	
46-01-AL	A	B	C	
13-01-BS	A	B	C	D
46-02-EA		B	C	D
16-01-BK		B	C	D
24-01-TM		B	C	D
24-01-AM		B	C	D
13-01-HN		B	C	D
06-02-DG		B	C	D
46-01-EMB		B	C	D
CP63		B	C	D
19-01-AK			C	D
42-02-TP			C	D
46-01-AK			C	D
10-02-TK			C	D
ATCC 51586			C	D
21-02-EH			C	D
13-02-MN				D

**Tableau 6** : Classement des isolats par rapport au poids frais des nodosités selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5%.