

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Faculté : sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département :biologie

Spécialité : microbiologie appliquée

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master

**Isolement et caractérisation des bactéries Rhizobium de quelques génotype de lentille cultivé dans la zone Oued Smar - alger**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> HARIZI hanane

M<sup>elle</sup> BELKACEMI ikram

M<sup>elle</sup> BENMBAREK rania

Le jury composé de :

Président	Mr Lazali Mohamed
Examineur	Mr Aoun Omar
Promoteur	Mr Bousalhih Brahim
co-promotrice	M <sup>elle</sup> Boughanem Wassila

Année universitaire : 2019/2020

# Remerciements

*Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir accordé la santé, le courage, la volonté, la patience et la chance pour faire ce travail.*

*Nos sincères remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre promoteur **Monsieur BOUSALHIH Brahim** pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa patience, sa disponibilité. Et notre co-promotrice **M<sup>lle</sup> BOUGHLANEM Wassila** pour leur soutien et encouragement et ses conseils précieux.*

*Nous remercions également:*

***Mr LAZALI Mohamed** pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

***Mr AOUN Omar** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont aussi à tous nos enseignants,*

*particulièrement les enseignants de la spécialité microbiologie appliquée, ainsi qu'aux membres du Département biologie de L'Université Djilali Bounaama - Khemis-Miliana.*

*Nos remerciements s'adressent à ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Pour tous la promotion microbiologie appliquée 2019/2020.*

*Hanane, Ikram, Rania*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail avant tout à mes chères parents, qui ont tout sacrifié pour mon bien et qui ont éclairé ma route par leur compréhension, leur soutien, je souhaite que dieu les garde en bonne et parfaite santé et leur donne une longue vie.*

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon mari Djallal.*

*A mes frères Mohamed, Ahmed, Mostapha et ainsi que ma chère sœur Marwa .*

*A ma grande mère maternelle Mahdjouba et mon grand père mhamed.*

*A mes oncles, mes tantes .*

*A toute la famille Harizi et Belmestefaoui .*

*A mes binômes Ikram et Rania.*

*Hanane*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chères parents, que Dieu ait pitié d'eux, j'ai toujours rêvé qu'ils me verraient en ce moment, le jour ou j'aurais obtenu mon diplôme, grâce à eux je suis arrivé ici , ils sont la source de ma réussite et la source de ma force.*

*Mes chères sœurs Rima, Asma, Wafa , Hanaa , pour leurs encouragements permanents, leur amour et leur soutien moral.*

*Mon oncle Saïd et sa femme Wahiba*

*Mon fiancé Adel.*

*Mes copines Nesrin et Halima*

*Mes binômes Hanane et Rania*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.*

*Ikram*

# *Dédicace*

*A mes très chers parents, sources de vie, d'amour et d'affection.*

*A mes chers frères **Malik** et **Nadji** et ma sœur **Selma**, source de joie et de bonheur.*

*A toutes ma famille, source d'espoir et de motivation .*

*A tous mes amis, tout particulièrement **Ikram** et **Hanane** .*

*A vous chers lecteur .*

*Rania*

## Résumé

En Algérie, la production des légumineuses alimentaires et fourragères est affecté par les contraintes environnementales climatiques (températures élevées, déficit hydrique, etc.). la symbiose Rhizobium-légumineuses conduit à la formation des nodules racinaires fixateurs d'azote atmosphérique. L'objectif de notre essai est d'étudier les bactéries nodulant les racines de la lentille, plusieurs génotypes ont été semis au niveau de la Ferme de Démonstration et de la Production de Semences (FDPS) de Oued Smar wilaya d'Alger ; afin de sélectionner les génotypes qui répondent et s'adaptent aux facteurs environnementaux (climatiques et édaphiques). On enchaîne notre étude d'effectuer les paramètres suivants : isolement des bactéries des nodules, prélèvement des nodules racinaires, stérilisation des nodules, extraction des bactéries des nodules, purification des colonies, conservation des isolats, le test de nodulation, caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des isolats bactérienne . Mais en raison de cette pandémie Coronavirus qui nous à empêché de poursuivre notre essai qu'il s'agit de la réalisation de projet de fin d'étude .

**Mots clé :** Rhizobium – FDPS – nodule – coronavirus - isolats bactérienne.

## Abstarct

In Algeria, the production of food and forage legume is affected by environmental and climatic stresses (high temperature, water deficit...). The symbiosis *Rhizobium*-legume leads to the formation of root nodules fixing atmospheric nitrogen. The objective of our test is to study bacteria nodating to the roots of the lentil. Several genotypes were sown at the level of the Demonstrarion and Seed Production Farm (FDPS) of oued smar wilaya of Algiers, to select genotypes that respond and adapt to environmental factors (climatic and edaphic).

The following parameters are included in our study: Isolation of bacteria from nodules, Collection of root nodules, Sterilization of nodules, Extraction of bacteria from nodules, Purification of colonies, Preservation of isolates, Nodulation test, Morphological, Biochemical and physiological characterization of bacterial isolates. But because of this Corona virus pandemic that has prevented us from continuing our trial this is the completion of end-of-study project.

**Keywords :** *Rhizobium* - FDPS - nodule - Corona virus - bacterial isolates.

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Arbre phylogénétique des sous-familles de légumineuses.....	4
<b>Figure 2 :</b> Morphologie d'une plante de lentille .....	7
<b>Figure 3 :</b> Cycle biologique de lentilles.....	8
<b>Figure 4 :</b> Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC, 2013).....	10
<b>Figure 5 :</b> Les Bactéries du genre <i>Rhizobium</i> .....	12
<b>Figure 6 :</b> Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S, 15 genres $\alpha$ -protéobactéries - 05 genres $\beta$ -protéobactéries et 02 genres $\gamma$ -protéobactéries. Les genres engras contiennent les rhizobiums nodulants les légumineuses (Masson-Boivin et al., 2009).....	14
<b>Figure 7 :</b> Schéma des agents participants au cycle de l'azote (Visionlearning, 2009).....	20
<b>Figure 8 :</b> Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de rhizobiums. Ac : acetyl, Ara, arabinosyl; Cb, carbonyl; Fuc, fucosyl; Me, methyl; S, sulfuryl (Cullimore et al., 2001).....	22
<b>Figure 9 :</b> Dialogue moléculaire <i>Rhizobium</i> -Légumineuse (Lindström et al., 2010).....	23
<b>Figure 10 :</b> Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante légumineuse (laboratoire press, 2007).....	25
<b>Figure 11 :</b> Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé ( <i>M. truncatula</i> ) (Patriarca et al., 2004).....	27
<b>Figure 12 :</b> Situation géographique de l'FDPS de l'ITGC de Oued Smar (Google Earth).....	29
<b>Figure 13 :</b> Dispositif expérimentale de l'essai.....	33
<b>Figure 14 :</b> photo de semis des génotypes de la lentille manuellement au niveau de la FDPS de Oued Smar.....	34

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote.....	19
<b>Tableau 2</b> : Différences principales entre les nodules de type déterminé et indéterminé (Sutton, 1983 ; Hirsch,1992).....	26
<b>Tableau 3</b> : Valeurs pluviométriques mensuelles de la campagne 2019/2020 enregistrées à Oued-Smar Comparées à la moyenne de 89/2017.....	30
<b>Tableau 4</b> : Analyses physico-chimique du sol.....	32

## Liste des graphes

**Grphe 1** : Hauteurs pluviométriques mensuelles enregistrées à Oued-Smar durant la campagne 2019-2020 Comparées à une moyenne de 28 ans (1989-2017).....30

**Grphe 2** : la pluviométriques mensuelles de la campagne 2019/2020 enregistrées à Oued-Smar Comparées à la moyenne de 89/2017 par saison.....31

## Liste des abréviations

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ARN** : acide ribonucléique

**ADNr 16S** : ADN ribosomique 16S

**atm** : atmosphère

**BNL** : bactéries nodulant légumineuses

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism ( polymorphisme de longueur des fragments de restriction )

**PCR** : polymerase chain Reaction ( Réaction en chaine de polymérisation)

**YMA** : Yeast Mannitol Agar

**ITGC** : Institut Technique des Grands Cultures

**FAO** : Food and Agriculture organisation

**FDPS** : Ferme de Démonstration de la Production de Semences

**ARA** : Arabinose

**FSN** :Fixation Symbiotique de l'Azote

**Nod** : Nodulation

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Etude bibliographique</b>	
1.Légumineuses .....	3
1.1.Généralités.....	3
2.lentille.....	6
2.1.Donnée botanique et génétique de lentille.....	6
2.2.Cycle biologique de Lentille .....	7
2.3.Caractéristiques écologiques et agronomiques de la lentille.....	8
2.4.Distribution et usages de la culture de la lentille.....	9
2.5.Situation de la culture de la lentille en algérie.....	10
2.6.Intérêt de la lentille .....	11
3.Rhizobium.....	11
3.1.Généralité.....	11
3.1.1. Caractères morphologiques.....	11
3.1.2. Caractères biochimiques.....	12
3.1.3. Caractères physiologiques.....	13
3.1.4.Caractères cultureux.....	13
3.1.5. Diversité taxonomique des rhizobiums.....	13
3.2.Méthode d'étude de la caractérisation des rhizobium.....	14
3.2.1.Méthodes phénotypiques.....	14
3.2.2.Méthodes moléculaires.....	15
3.3. Intérêt des bactéries nodulants les légumineuses en biotechnologie.....	16
4.Symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses .....	16

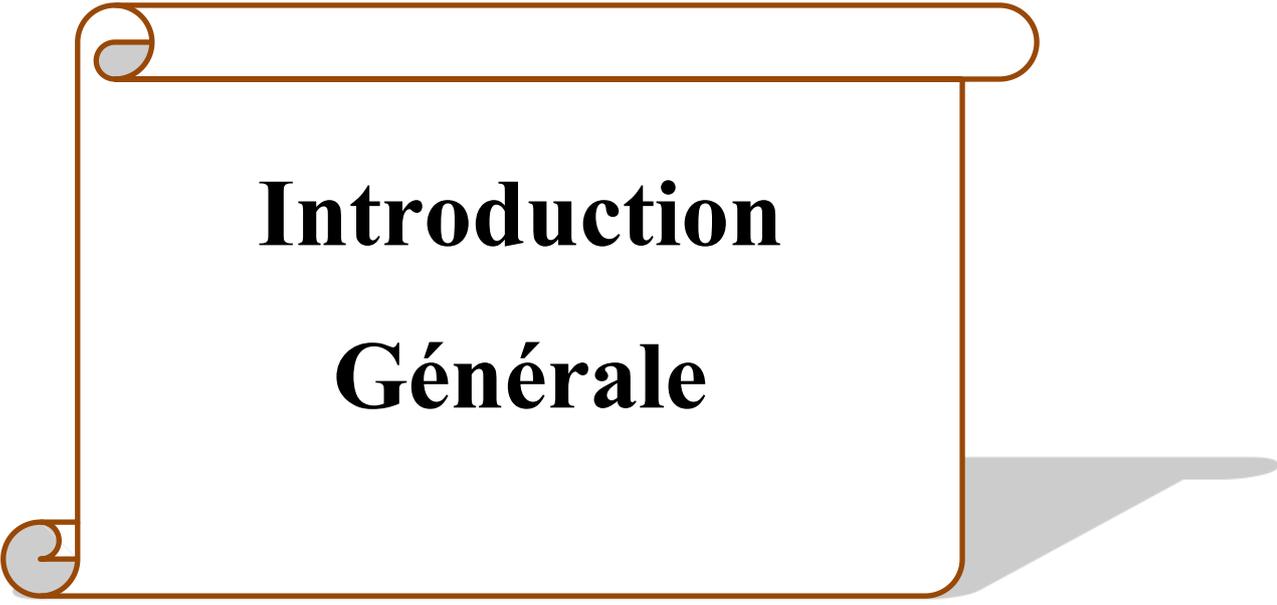
4.1. Fixation biologique de l'azote atmosphérique.....	17
4.1.1. La nitrogénase.....	17
4.1.2. les fixateurs d'azote.....	18
4.1.3. Le cycle d'azote.....	20
4.2. Nodulation.....	21
4.2.1. Les substances responsables de la nodulation.....	21
4.2.2. Processus de nodulation.....	23
5. Facteurs influencent la Symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses.....	
5.1. le ph du sol.....	27
5.2. L'eau.....	28
5.3. La température.....	28
5.4. le stress hydrique.....	28

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

1. Objectif de l'essai.....	29
2. Présentation de la région d'étude.....	29
2.1. Localisation de l'essai .....	29
2.2. Caractéristiques climatiques.....	30
2.3. Analyses physico-chimiques du sol.....	31
3. Matériel végétal .....	32
3.1. Dispositif expérimental.....	32
4. Gestion de l'essai .....	33
4.1. Travail du sol.....	33
4.2. Semis.....	33

4.3. Entretien de la culture .....	34
4.3.1. Traitements appliquées .....	34
4.3.2. Désherbage.....	34
4.4. Paramètres étudié.....	34

## **Références bibliographiques**



# **Introduction Générale**

## Introduction

Les légumineuses sont des plantes herbacées considérées comme un support de recherche fondamentale et un matériel pour l'amélioration des plantes cultivées en raison de leurs capacités de s'associer avec des bactéries du genre *Rhizobium*.

En Algérie, la culture des légumineuses à graine constituent avec les céréales une composante de base dans les cultures traditionnelles importantes, qui sont le pois chiche, la lentille, la fève, la féverole, et le pois, ces légumineuses sont intégrées à la nutrition animale.

Tout particulièrement, la lentille est cultivée comme une annuelle d'été dans les zones tempérées et comme une annuelle d'hiver dans les régions subtropicales. Sous les tropiques, elle est cultivée à des altitudes élevées (1800 ; 2500 et 2700 m) ou comme plante de saison froide (Sehirali, 1988 ; Ozdemir, 2002).

Certaines plantes, notamment les légumineuses, établissent des relations symbiotiques avec des bactéries appelées *Rhizobiums*, capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, Cette symbiose leur confère une disponibilité directe de l'azote atmosphérique qui est réduit dans les nodosités par la nitrogénase de ces *Rhizobium*.

L'azote est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone, La fixation potentielle de l'azote par les *Rhizobium* est limitée par des contraintes environnementales dont l'impact est parfois considérable de sorte que la fixation de l'azote réelle peut être beaucoup plus faible que la fixation potentielle. Ces contraintes sont de nature physique, chimique et biologique.

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine ou parfois sur la tige de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées nommées nodules (Dénarié et al, 1996). Au sein des nodules, la bactérie différenciée en bactéroïdes transforme l'azote de l'air en une forme directement assimilable par la plante. En échange la

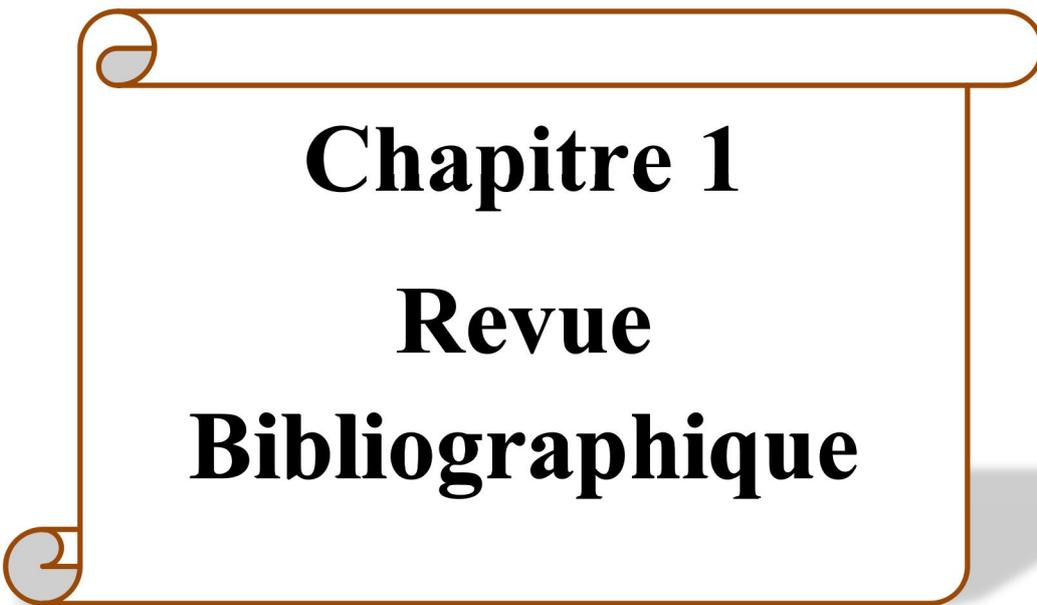
plante fournit à la bactérie les substrats carbonés issus de la photosynthèse. La survie des Rhizobium dans le sol, la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action d'un certain nombre de facteurs du milieu tels que le pH du sol, l'eau, la température et le stress salin.

C'est dans ce contexte que s'intègre notre travail, qui vise à étudier l'isolement et la caractérisation des bactéries Rhizobium nodulant les racines de la lentille cultivée dans la zone Oued Semar, wilaya d'Alger .

Nous avons subdivisé notre travail en deux parties :

La partie bibliographique : consiste à une synthèse bibliographique sur la lentille, Rhizobium, symbiose Rhizobium-légumineuses et les facteurs qui influencent cette symbiose.

La partie expérimentale : consacrée à la description de la zone d'échantillonnage et les méthodes utilisées.



**Chapitre 1**  
**Revue**  
**Bibliographique**

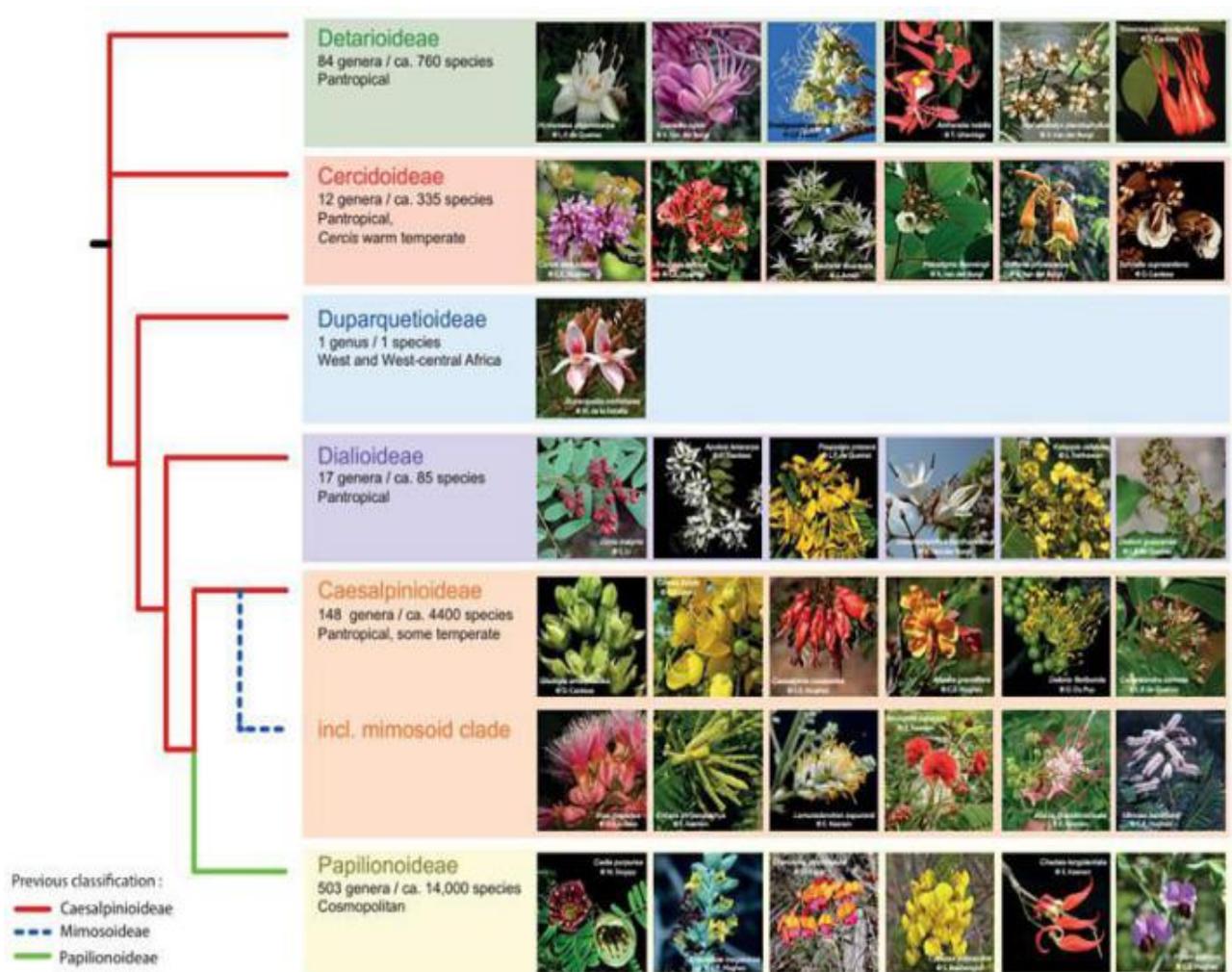
## 1. Les légumineuses

### 1.1. Généralités

Fabacées, au sens large, est adopté en classification phylogénétique APG II (2003).. Ce groupe est nommé Fabaceae, il comprend 18000 espèces réparties dans trois sous-familles (En classification classique, ce groupe des plantes serait l'ordre des Fabales avec trois familles) (Sebihi, 2008).

Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s'entendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles (Jean-Luc, 2007) :

- Sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière;
- Sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée ;
- Sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon (Sebihi, 2008).



**Figure 1:** Arbre phylogénétique des sous-familles de légumineuses

Chinese Academy of Sciences

Deux groupes de légumineuses peuvent être distingués :

- Les légumineuses fourragères (trèfle, luzerne, sainfoin...) consommées soit directement par pâturage des prairies, soit récoltées sous forme de fourrage, voire déshydratées.

- Les légumineuses cultivées pour leurs graines . Dans cette catégorie, on distingue encore :

Les espèces à graines riches en protéines et en huiles, sans amidon, classées comme oléagineux (soja,arachide, ...) et les espèces à graines riches en protéines, classées comme protéagineux (pois, féverole, fève,...) ou légumes secs (haricot, lentille, pois chiche,...) (Zhu et al.,2005). Les légumineuses à graines constituent toujours une part importante de

l'alimentation du monde, particulièrement dans les pays en développement où elles sont la principale source de protéines pour l'Homme. C'est le cas de la Fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le Haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le Pois Chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et le Soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le Pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier (Zhu et al., 2005).

L'intérêt agronomique de légumineuses provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Sebihi,2008). Au total, un champ de Trèfle (*Trifolium subterraneum*) fixe entre 50 et 100 Kg d'azote par hectare et par an. Le Soja (*Glycine max* L.) est connu par leur richesse en protéines, apportent au sol plus de 300 et jusqu'à 500 Kg d'azote par hectare et par an (Claude et al.,2003).

Cette fixation permet de produire en abondance des protéines végétales ce qui constituées une source très importante dans l'alimentation humaine et animale. Les graines de légumineuses sont des aliments d'excellente qualité, car leur contenu en protéines est parmi les plus élevés de toutes les plantes destinées à l'alimentation.

En effet, la capacité de légumineuses de fixation d'azote rend inutile. L'utilisation d'engrais azotés dans la synthèse, le transport et l'épandage, et elles consomment des combustibles fossiles (2 tonnes de fuel pour une tonne d'ammoniac) et contribuent à l'effet de serre.

Dans les systèmes de culture utilisant les rotations, l'azote fixé par les légumineuses peut être utilisé d'abord par elles-mêmes, puis par les cultures suivantes qui peuvent bénéficier indirectement par l'entremise des résidus qu'elles laissent. Enfin, elles servent également de cultures de fourrages, d'engrais verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures et des parfums (Sebihi, 2008).

## 2.lentille



### 2.1.Donnée botanique et génétique de lentille

D'un point de vue morphologique (Figure 2), les lentilles ont des tiges minces et atteignent rarement 45 cm de hauteur et ont une croissance indéfinie (Saskatchewan, 2002 ; Saskatchewan Pulse Growers, 2000).

Les deux premiers nœuds de la tige sont vestigiaux et se situent au niveau du sol ou sur la surface. Si la dominance apicale est brisée ou si les conditions de croissance sont favorables, la plante peut produire jusqu'à quatre rameaux basiliaires à partir des bourgeons dormants du deuxième de ces nœuds et jusqu'à cinq rameaux aériens à partir des cinq nœuds situés immédiatement sous la première fleur. Si les conditions de croissance sont extrêmement favorables, les rameaux aériens peuvent produire des rameaux secondaires. Les feuilles sont pennées et comportent jusqu'à 10 paires de folioles. La première fleur de la tige principale est située à l'aisselle du 11e, 12e ou 13e nœud non vestigial. Les gousses, aplaties, sont isolées ou disposées en paires et apparaissent à l'aisselle du 11e, 12e ou 13e nœud et des nœuds suivants (Slinkard, 1990, Street *et al.* 2008).

Chaque gousse possède un court pédicelle et renferme une ou deux petites graines en forme de loupes. La couleur du tégument séminal est variable, allant du blanc (absence de tannins) au vert pâle, au gris, au brun et au noir, et porte souvent des mouchetures violacées de grandeur variable (Vandenberg et Slinkard, 1990). par ailleurs leurs graines sont classées selon leur poids (les *Microsperma* :  $\leq 40$  gr / 1000 grains ; les *Macrosperma* :  $\geq 50/1000$

grains ) et leur couleur ,vertes ou rouges selon les exigences commerciales (Wenger ,2004 ; Sexana, 2009).



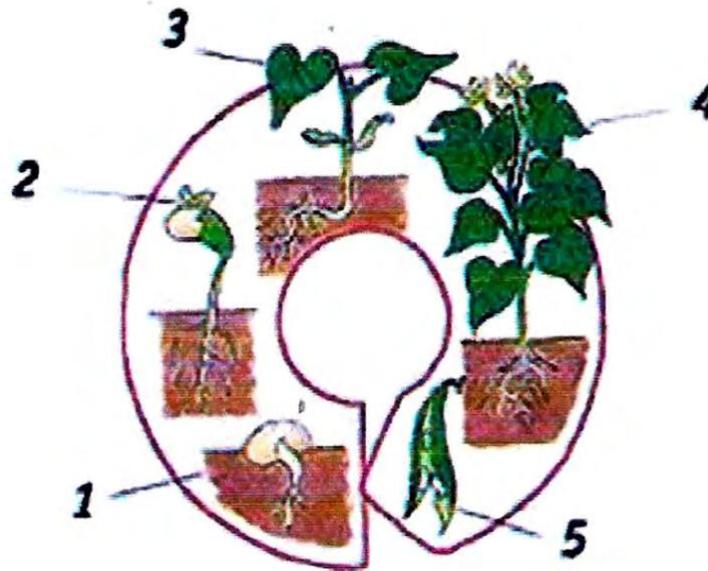
**Figure2:** Morphologie d'une plante de lentille : (1) Plante, (2) Feuilles, (3) Gousse, (4) Graine.

## 2.2.Cycle biologique de Lentille

Lorsque les températures sont optimales, les graines de lentilles germent en 5 à 6 jours et la floraison débute entre la 6ème et la 7ème semaine après le semis. Le cycle de croissance est de 80 à 110 jours pour les cultivars à cycle court et de 125 à 130 jours pour les cultivars à cycle long (Begiga, 2006) .Celui-ci comprend deux phases (Schwartz et Langham ,2012).

- Phase végétative : cette phase comprend deux stades : la croissance et la production des feuilles.

- Phase reproductive : elle est représentée par la floraison, la fructification et la production des graines (Figure 3).



**Figure 3 :** Cycle biologique de lentilles : (1) Graine, (2) Germination, (3) Croissance, (4) Floraison, (5) Fructification.

### 2.3. Caractéristiques écologiques et agronomiques de la lentille

La lentille est cultivée comme une annuelle d'été dans les zones tempérées et comme une annuelle d'hiver dans les régions subtropicales. Sous les tropiques, elle est cultivée à des altitudes élevées (1800 ; 2500 et 2700 m) ou comme plante de saison froide (Sehirali, 1988 ; Ozdemir, 2002).

Elle pousse à des températures moyennes de 6 à 27°C, mais elle ne convient pas aux régions tropicales chaudes et humides. Un gel intense ou prolongé et des températures bien supérieures à 27° C affectent énormément la croissance. La lentille nécessite une pluviométrie annuelle d'environ 750 mm et un temps sec au moment de la récolte, mais des précipitations annuelles de 300 à 2400 mm sont tolérées. Elle tolère modérément la sécheresse, mais il existe des différences entre les cultivars.

La lentille a normalement besoin de jours longs pour fleurir, mais là aussi la réponse varie selon les génotypes, et il existe des cultivars indifférents à la longueur du jour. En Ethiopie, la lentille se cultive au cours de la brève saison des pluies (février mai) et pendant la principale saison des pluies (juin décembre), la seconde étant prédominante (Hawatin et *al.* 1980).

La lentille peut se cultiver sur de nombreux types de sol, depuis les sols sableux à argileux assez lourds, mais elle ne supporte pas les sols inondés ou engorgés. Un pH avoisinant 7,0 est optimal pour la production de la lentille, mais elle tolère des pH de 4,5 à 9,0. (Saskatchewan, 2002).

La lentille est généralement très sensible à la salinité. Pour éviter l'asphyxie racinaire, la culture est semée sur des vertisols à la fin de la saison des pluies (en septembre) et croît sur l'humidité résiduelle du sol (Sehirali, 1988 ; Ozdemir, 2002).

#### **2.4. Distribution et usages de la culture de la lentille**

Actuellement la culture de la lentille est très largement répandue à travers les régions du monde, après son introduction aux Amériques en Nouvelle Zélande et en Australie Elle est maintenant largement cultivée dans les régions tempérées et subtropicales (Omar et *al.* 2013). Selon la FAO (2010), la production mondiale des lentilles a atteint 4.2 millions de Tonnes pour une superficie cultivée de 4.6 millions d'Hectares soit un rendement moyen de 10,95qx/Ha. Ces rendements considérés comme faibles, sont le résultat de l'induction de certains facteurs biotiques et abiotiques (Omar et *al.* 2013). Les principaux pays producteurs de la Lentille sont : Le Canada, la Turquie, l'Iran, l'Australie, la Chine et la Syrie alors que les principaux importateurs sont : l'Egypte, l'Algérie, la Colombie, la France, le Pakistan et l'Espagne. (Ahlawat, 2012).

La lentille est aussi surtout cultivée pour ses graines mûres, qui sont consommées principalement en sauces et en soupes. De nombreux autres plats à base de lentilles sont préparés dans différents pays. Les graines sont réduites en une farine qui sert à fabriquer des galettes et des pains, ou à préparer des aliments spéciaux destinés par ex. aux nourrissons ou aux invalides. Les jeunes gousses, les graines germées et les feuilles se consomment comme légume (Yunnus et Jackson, 1991). On nourrit parfois les animaux, en particulier les volailles, avec des graines de lentille pour leur procurer des protéines. Elles sont parfois employées comme source d'amidon dans l'industrie textile et dans l'imprimerie. Les cosses, les téguments et les tiges feuillées fraîches ou sèches fournissent du fourrage pour le bétail (Yunnus et Jackson, 1991).

## 2.5. Situation de la culture de la lentille en algérie

En Algérie, la culture des lentilles n'occupe que 1.5% de la totalité des terres réservées aux légumineuses alimentaires (Ait Abdellah *et al.* 2011) ; elle s'étale sur de grandes surfaces dans les hautes plaines (Tiaret, Saida, Sétif) et les plaines intérieures (Bouira, Médéa, Mila) (Figure 4).

Par ailleurs, compte tenu de leurs capacités fixatrices de l'azote atmosphérique (46 à 192 kg d'azote par hectare), les lentilles sont souvent cultivées en rotation avec les céréales comme le blé (Rennie et Dubetz, 1986 ; Smith *et al.*, 1987 ; McNeil *et al.*, 1996 ; Rochester *et al.* 1998 ; Shah *et al.* 2003), ce qui les soustrait d'ailleurs à une forte demande d'azote, mais elles ont besoin par contre d'apport de phosphore (engrais phosphorique) pour le développement de leur système racinaire (Sashatchewan, 2002).



**Figure 4 :** Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC, 2013).

## 2.6. Intérêt de la lentille

La culture de la lentille enrichit le sol en azote, donc elle induit une diminution en apport en engrais azoté et assure un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation agricole et la diversification de la production agricole. La plante est

surtout cultivée pour ses graines, récoltées et exportées comme aliment. Cependant, la paille est aussi utilisée, comme aliment de qualité supérieure pour le bétail ou comme source de matière organique pour l'amélioration des sols (Saskatchewan Pulse Growers, 2000). Les graines de lentille peuvent servir de nourriture parfois aux animaux, en particulier les volailles pour leur procurer des protéines. La lentille se cultive parfois pour le fourrage ou comme engrais vert (Brink et Belay, 2006).

### **3. Rhizobium**

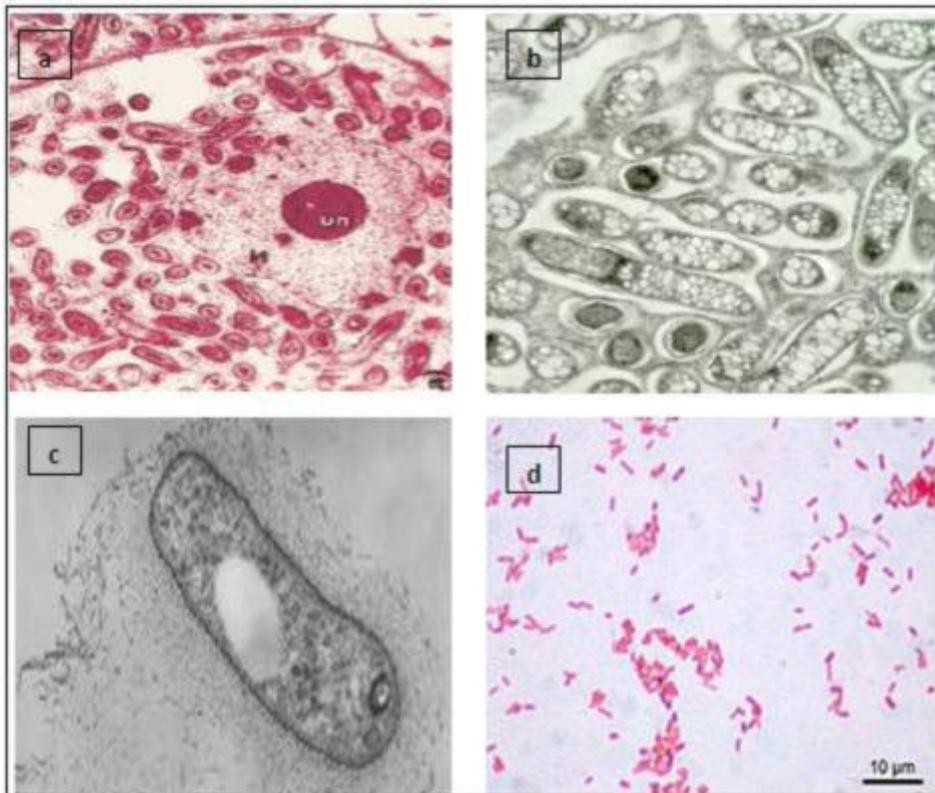
#### **3.1. Généralités**

##### **3.1.1. Caractères morphologiques**

Du grec rhiza qui signifie (racine) et bio (vie), *Rhizobium* signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Ce sont des bactéries Gram négatif, non sporulantes, on distingue deux formes :

- **La forme végétative:** les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$  de largeur sur 1,2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobiums à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobiums à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

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



**Figure5 :** a) Les Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope (x 1 000).

b) Bactéroïdes du genre *rhizobium* – légumineuse *Vicia faba* (Dolisi, 2010)

c) Photo de *rhizobium*

d) bactéries gram négatif *rhizobium*.

### 3.1.2. Caractères biochimiques

Les *rhizobium* sont des bactéries hétérotrophes, ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994).

### 3.1.3. Caractères physiologiques

*Rhizobium* est un microorganisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6,8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

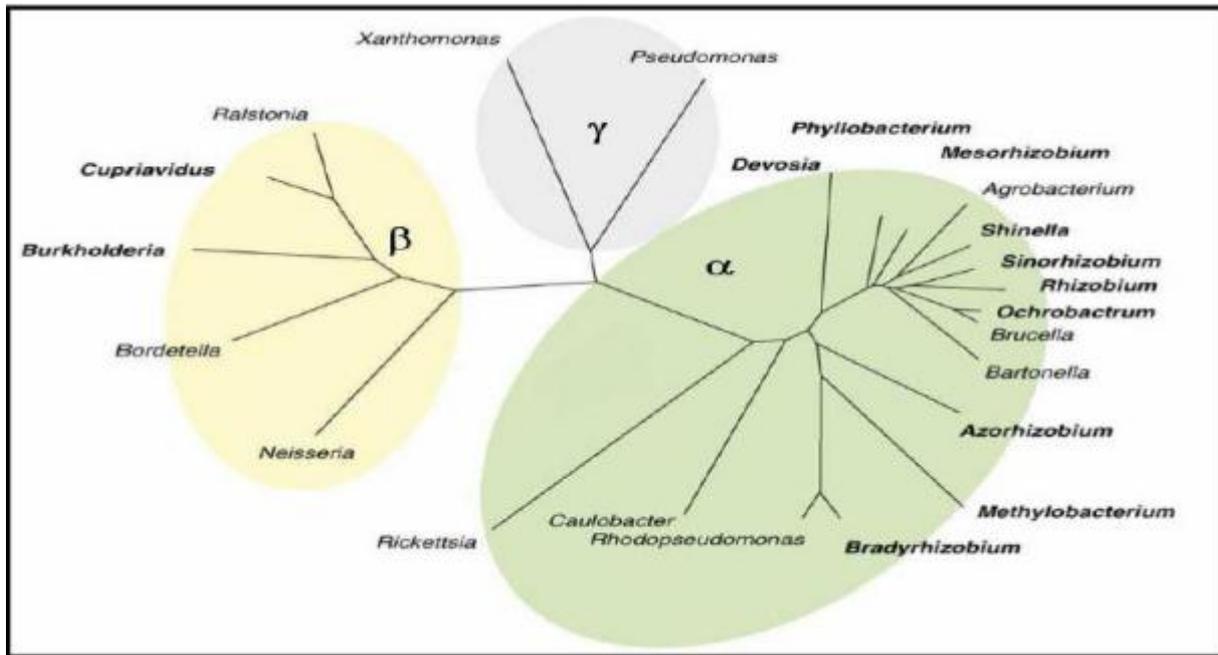
### 3.1.4. Caractères culturels

Les rhizobiums à croissance rapide produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours. Les *Bradyrhizobium* à croissance lente. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours. Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobiums, sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaires, blanches, opaques ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pales rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

### 3.1.5. Diversité taxonomique des rhizobiums

La classification des rhizobiums est basée sur leur capacité symbiotique et leur spécificité d'hôte, toutes les bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses étaient classées en un seul genre *Rhizobium*. Aujourd'hui, le terme de bactérie nodulant les légumineuses (BNL) utilisé par Zakhia et al (2004) est plus adéquat et convient mieux que celui de rhizobiums qui dérive du nom du genre *Rhizobium*, pour désigner l'ensemble des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques capables d'entrer en symbiose avec les légumineuses. Actuellement, les rhizobiums sont 13 genres et plus de 100 espèces symbiotiques appartenant aux sous classes alpha et beta Protéobactéries (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobiums>). Quatre genres d' $\alpha$ -Protéobactéries constituent les symbiotes majoritaires de la plupart des espèces de légumineuses rencontrées à travers le monde : *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) et *Bradyrhizobium*.

Toutefois il existe d'autres genres d' $\alpha$ -Protéobactéries, induisant des nodules, moins fréquemment isolés, ayant une distribution géographique réduite et un spectre d'hôte limité, et découvertes plus récemment : *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, et *Shinella*. Au cours des dernières années des rhizobiums ont été aussi découverts dans les beta-Protéobactéries, dont les genres *Burkholderia sp* et *Cupriavidus* (Figure 5). La taxonomie des rhizobiums a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études.



**Figure 6 :** Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S, 15 genres  $\alpha$ -protéobactéries - 05 genres  $\beta$ -protéobactéries et 02 genres  $\gamma$ -protéobactéries. Les genres en gras contiennent les rhizobiums nodulants des légumineuses (Masson-Boivin et al., 2009).

### 3.2. Méthodes d'études de la caractérisation des rhizobiums

#### 3.2.1. Méthodes phénotypiques

La caractérisation phénotypique classique des rhizobiums se base sur des critères morphologiques symbiotiques, biochimiques, et physiologiques. Des critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne ( la forme, nombre et type de flagelles, la coloration de Gram, présence d'endospores ), les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme). Des critères symbiotiques indiquant la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée. Des critères biochimiques évaluant la présence et/ou l'activité de différents enzymes comme la nitrate réductase, et l'uréase. Des critères physiologiques (croissance à différentes températures, tolérance aux variations du pH et aux différentes concentrations en sel), et leur capacité d'utiliser différents carbohydrates comme source de Carbone (Vincent, 1970 ; Graham et al., 1991) .

### 3.2.2. Méthodes moléculaires

Il existe de nombreuses techniques moléculaires chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents certaines utilisent les acides nucléique ADN ou ARN pour étudier la localisation ou la variabilité en séquence des gènes ou de fragments de gènes. Les plus couramment utilisées dans l'étude de la diversité des rhizobiums sont les suivantes:

- Détermination du % Guanine + Cytosine (%G+C) du génome.

le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage de bases G et C (Johnson 1984). Ce pourcentage varie chez les bactéries de 24% et 76%. Cette méthode génotypique classique n'implique pas que les bactéries sont proches à cause de la disposition des bases sur l'ADN (Vandamme et col.1996; Tortora et col,2003). cette valeur de mol% G+C est généralement donnée dans la description d'une nouvelle espèce, d'autant qu'il est nécessaire de la détermination pour définir les conditions d'hybridation ADN/ADN.

- L'hybridation ADN : ADN : technique permettant de mettre en évidence au sein d'une cellule ou d'un tissu, une séquence d'acide nucléique. Elle est basée sur le principe de complémentarité des bases nucléiques.

- Le séquençage de l'ADN 16S : c'est principalement l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S qui est le marqueur moléculaire le plus utilisé dans l'analyse des relations phylogénétiques bactériennes au niveau du genre et espèces Ce gène a comme avantage d'être présent chez toutes les bactéries, d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, et de fournir une séquence suffisamment informative .Dans les années 1990, l'ADN 16S est devenu le marqueur taxonomie le plus important chez les rhizobiums conduisant à la répartition des genres inclus dans la famille *Rhizobiumsceae* et la création d'un nouvel ordre appelé "rhizobiumsles" proposé dans le Bergey's Manual (Kuykendall et al., 2005). Ainsi l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce.

- Les méthodes de typages basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) : exemple PCR/RFLP.

### 3.3. Intérêt des bactéries nodulantes des légumineuses en biotechnologie

L'intérêt majeur des bactéries nodulantes chez la famille des légumineuses réside dans leur capacité à fixer l'azote atmosphérique dans le cadre d'une relation symbiotique avec les espèces végétales de cette famille dont plusieurs plantes d'intérêt économique font partie. Du fait que cette relation soit d'une grande spécificité, la sélection et l'étude de ces bactéries pour des fins agronomiques est d'une importance majeure. Aujourd'hui les biotechnologistes travaillent sur l'inoculum qui consiste à introduire les souches de *Rhizobium* dans l'écosystème plante-sol ; un inoculum étant une formulation des souches en porteur solide ou liquide et peut agir de plusieurs manières : Action directe, action indirecte, protection. Un bon inoculum doit être préparé avec des souches rhizobiennes d'une grande efficacité en conditions de champ. Elles doivent avoir une grande spécificité afin d'être compétitives pour la formation des nodules et être aptes à promouvoir les performances de l'hôte. Les souches rhizobiennes doivent survivre dans l'inoculum et maintenir ces propriétés durant la période de stockage. Elles doivent être tolérantes aux facteurs de stress tels que l'acidité, la dessiccation, température élevée et des pesticides chimiques (Baraibar 2000).

### 4. Symbiose *Rhizobium*-légumineuses

Le *Rhizobium* est une bactérie qui infecte les racines des légumineuses et donne naissance à des excroissances de type tumoral appelées nodosités. Le centre de chaque nodosité mature contient des milliards de bactéries qui fixent l'azote. La légumineuse hôte fournit l'énergie nécessaire à cette fixation en capturant l'énergie du soleil par le phénomène de la photosynthèse. Le rendement global de cette symbiose complexe dépend donc du rendement de chacun des deux organismes associés. Leurs caractéristiques génétiques revêtent donc une très grande importance, de même que la façon dont s'exerce leur interaction.

En outre, tout facteur nutritionnel ou environnemental influant soit sur la bactérie, soit sur la légumineuse, se répercute sur le rendement global de la symbiose. La complexité de cette dernière impose absolument que l'on effectue des recherches sur le terrain, où tous les facteurs peuvent être pris en considération.

#### **4.1. Fixation biologique de l'azote**

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de (azote moléculaire) en ( azote ammoniacal, ou ammoniac) . cette forme d'azote combinée représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant des relations en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004).

##### **4.1.1. La nitrogénase**

La réaction de la fixation de  $N_2$  est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui est constitué de deux composantes :

- la protéine molybd-ferrique ou dinitrogénase, cette protéine est le site de réduction de  $N_2$ , c'est un tétramère de poids moléculaire de 245 KD.

- la ferro-protéine ou dinitrogénase-réductase, cette deuxième protéine fournit les électrons à la dinitrogénase c'est un homodimère de poids moléculaire de 64KD.

C'est deux protéines sont conservées chez tous les organismes fixateurs de  $N_2$ , les électrons nécessaires à la réaction sont fournis par un puissant donneur d'électrons, la dinitrogénase-réductase accepte un électron et se complexe avec deux molécules de MgATP, puis s'associe avec la dinitrogénase pour former un complexe enzymatique actif. Il y a transfert d'un électron de la dinitrogénase-réductase à la dinitrogénase et simultanément, il y a libération de deux molécules de Mg-ADP et de phosphate.

Puis les deux composants de la nitrogénase se séparent et la dinitrogénase-réductase se prête à recommencer le transport d'un électron vers la dinitrogénase. Lorsque la molécule de dinitrogénase est suffisamment réduite, le substrat  $N_2$  est réduit en  $NH_3$ .

La réduction de protons en H<sub>2</sub> se produit en même temps que la réduction de N<sub>2</sub>, et requiert autant de protons qu'il y a d'électrons impliqués dans la réduction de N<sub>2</sub>.

L'azote ammoniacale formé est ensuite incorporé dans le glutamate, puis suit voies métaboliques divers.(DOMMERGUES et DUHOUX et DIEM, 1999).

#### **4.1.2.les fixateurs d'azote**

L'azote est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il constitue très fréquemment le facteur limitant principal pour la production végétale agricole.

La réserve principale d'azote terrestre est la lithosphère (98% de l'azote total) et non l'atmosphère. Cependant la concentration des formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance de la majorité des êtres vivants .L'azote moléculaire, constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains micro-organismes procaryotes appelés fixateurs d'azote, qui peuvent être libres ou symbiotiques.

Il y a plus de 150 ans que l'on a constaté que le sol contenait plus d'azote que la roche mère et qu'il existait donc une importante source d'azote inexplicée. Le rôle des micro-organismes dans ce phénomène a été reconnu en 1888 par Hellriegel et Wilfart en constatant que des légumineuses non nodulées étaient incapables d'incorporer l'azote moléculaire.

La découverte de la fixation de l'azote par les bactéries libres est due à Beijerinck, en 1901. Depuis, de nombreux genres bactériens ont été reconnus comme fixateurs. Ces genres représentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-microorganisme, les relations avec l'oxygène et les modes trophiques (Tableau 1).

**Micro-organismes libres**

## • Aérobie

## • Hétérotrophes

*Azotobacter spp.*; *Klebsiella pneumoniae*;  
*Beijerinckia indica*; *Azospirillum lipoferum*

## • Phototrophes: Cyanobactéries

## • Hétérocystées

*Nostoc*; *Anabaena*; *Calothrix*; *Tolypothrix*

## • Homocystées

*Trichodesmium*; *Oscillatoria*

## • Unicellulaires

*Gloeotheca*; *Gloeocapsa*

## • Anaérobies

## • Hétérotrophes

*Clostridium pasteurianum*; *Desulfovibrio vulgaris*;  
*Desulfotomaculum spp.* ; *Methanobacterium spp.*

## • Phototrophes

*Rhodospirillum rubrum*; *Rhodobacter capsulata*;  
*Chromatium vinosum*

**Microorganismes symbiotiques**

## • Légumineuses

## • à nodules racinaires

*Rhizobium meliloti*; *Rhizobium leguminosarum*  
*Bradyrhizobium japonicum*; *Sinorhizobium fredii*

## • à nodules caulinaires

*Azorhizobium caulinodans*

## • Symbioses actinorhiziennes

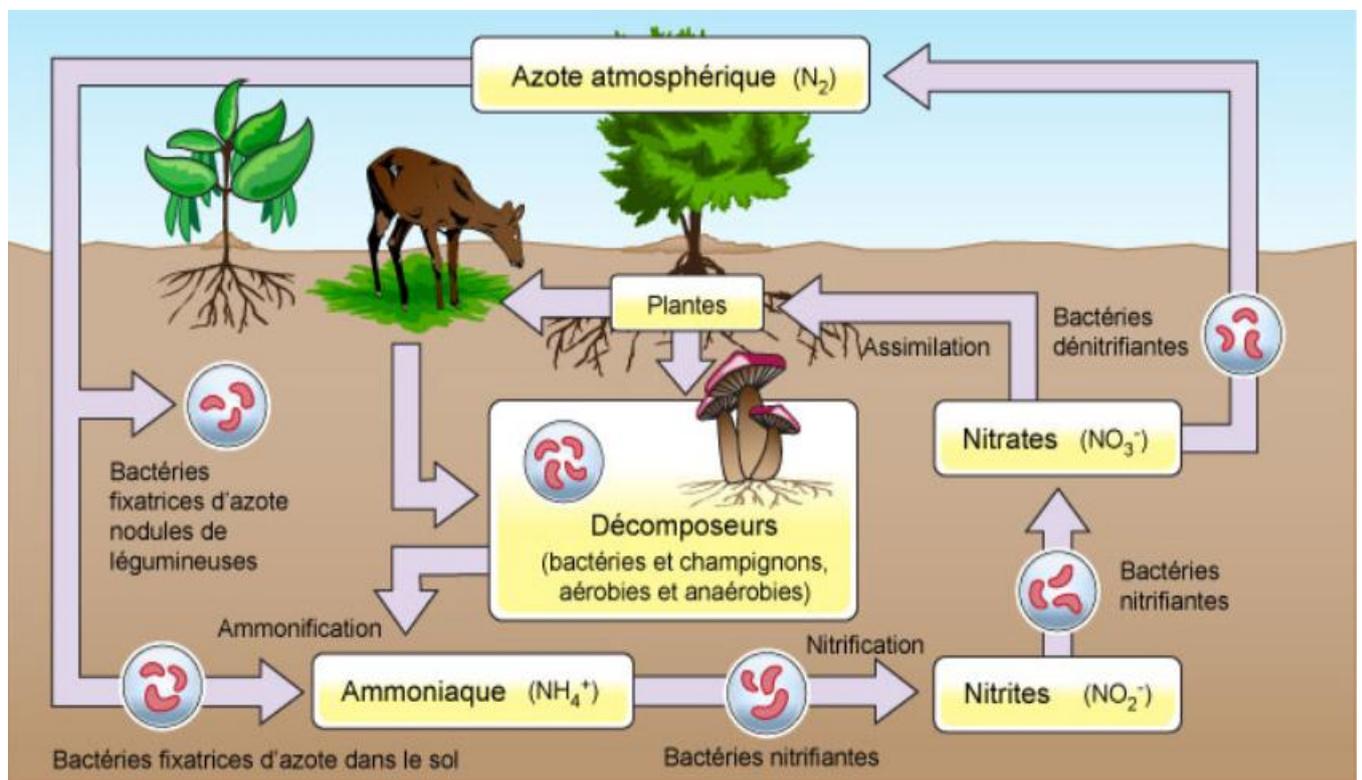
*Frankia*

## • Symbioses à cyanobactéries

• <i>Azolla</i>	<i>Anabaena azollae</i>
• <i>Cycas</i>	<i>Anabaena cycadeae</i>
• Lichens	<i>Nostoc</i>
• Mousses et hépatiques	<i>Nostoc</i>

**Tableau 1** : Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote

#### 4.1.3.le cycle d'azote



**Figure 7** : Schéma des agents participants au cycle de l'azote (Visionlearning, 2009).

le diazote va être fixé soit pas les bactéries symbiotiques\*, soit pas les bactéries libres\*. Il est ensuite transformé sous une forme d'ammoniac ( $NH_4^+$ ). En outre, l'ammoniac obtenue participera au cycle des bactéries nitrifiantes qui nous permettrons d'obtenir du  $NO_2^-$  et du  $NO_3^-$ . C'est donc ces formes d'azote minérales qui pourront être utilisées par les plantes.

Par ailleurs, nous savons que dans un milieu naturel, la fixation biologique représente 60% des entrées du cycle de l'azote. Ce sont les bactéries qui se chargent de cette fixation.

Les différentes étapes du cycle de l'azote :

#### •Ammonification

Cette étape correspond aux différentes molécules d'origine végétale ou animale présente dans le milieu. Les champignons et bactéries vont alors transformer le nitrogène en ammoniac. (Eartheclipse.com).

#### •Nitrification

La nitrification est le processus par lequel les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) vont subir une transformation en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ainsi qu'en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). (aquaportail)

#### •Dénitrification

Ce processus correspond à l'inverse de ce qu'on vient d'évoquer. Les nitrates sont transformés en gaz pour retourner dans l'atmosphère.

## 4.2.La nodulation

### 4.2.1.Les substances responsables de la nodulation

#### •Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol (Taylor et Grotewold, 2005 ; Gibson et *al.*, 2008), induisant l'expression des gènes de nodulation chez *Rhizobium* (Cooper 2007 ; Zhang et *al.*, 2009). Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes (Cooper, 2004 ; Perret et *al.*, 2000) dont les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses (Brencic et Winans, 2005).

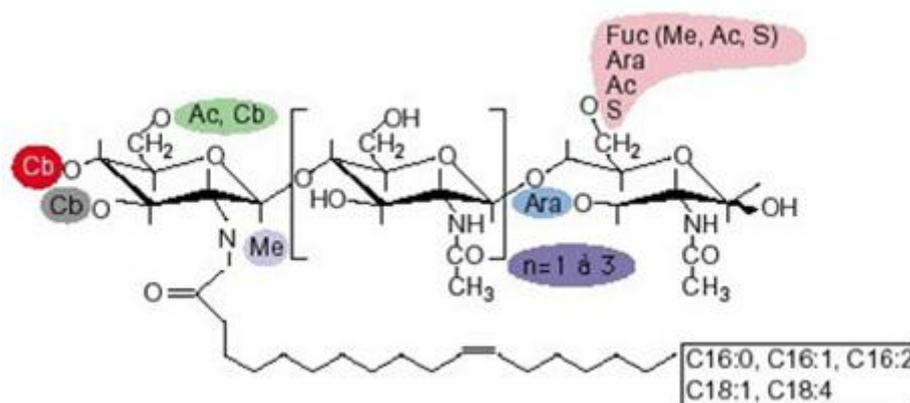
## •Facteur Nod

En présence d'inducteurs végétaux (flavonoïdes, bêtaïnes), les protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structure. L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires ou facteurs Nod, qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules (Boivin *et al.*, 1998).

Tous les facteurs Nod décrits sont des molécules lipochitooligosaccharidiques constitués d'un squelette de 3 à 6 résidus N-acétyl-D-glucosamine, substitué par une chaîne d'acyl au niveau de l'extrémité non réductrice et portant divers motifs structuraux aux deux extrémités de la chaîne oligosaccharidique (Boivin *et al.*, 1998).

La nature de l'acide gras et des autres décorations dépend de la souche ou de l'espèce de rhizobium (Boivin *et al.*, 1998). Ils jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debellé *et al.*, 2001).



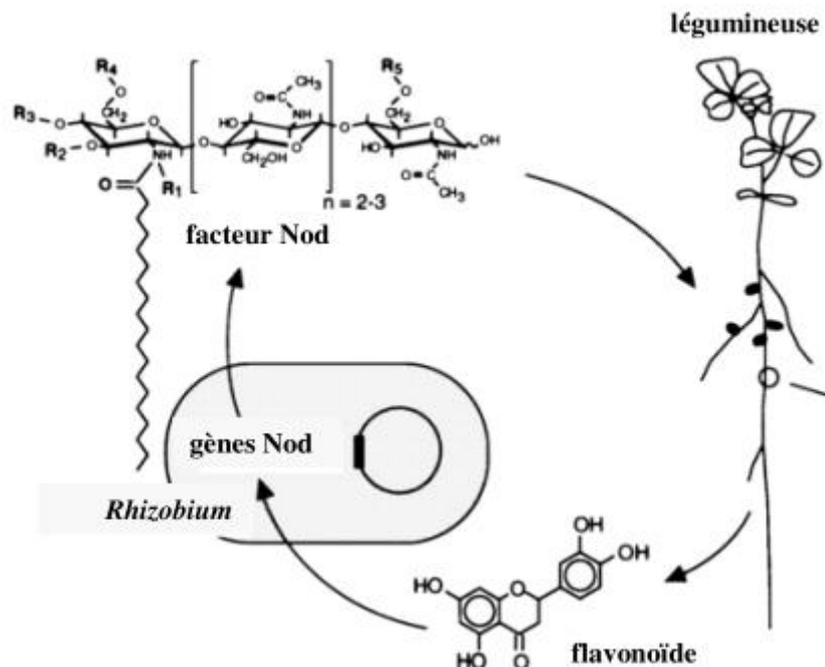
**Figure 8 :** Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de rhizobiums. Ac : acétyl, Ara, arabinosyl; Cb, carbonyl; Fuc, fucosyl; Me, méthyl; S, sulfuryl (Cullimore *et al.*, 2001).

#### 4.2.2. Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien (Grana, 2008).

##### •Attraction des bactéries dans la rhizosphère

Les bactéries de la famille des Rhizobiacées vivent de manière saprophyte dans le sol. Elles migrent en direction de la rhizosphère (zone du sol sous l'influence directe des racines) où les plantes relarguent des rhizodépôts composés de glucides, d'acides carboxyliques, d'acides aminés et de flavonoïdes, ces derniers ayant un effet attractif sur les bactéries. La mise en place de la symbiose fait intervenir des mécanismes de reconnaissance spécifique des partenaires impliqués. Dans un premier temps, les bactéries sont attirées par les flavonoïdes, premiers signaux relargués par la plante hôte. Ces molécules ont une action sur la transcription des gènes Nod chez la bactérie, induisant la production des facteurs Nod, molécules lipochitooligosaccharidiques (Denarie et al. 1996). Ces molécules se lient à des récepteurs de type lectines situés sur l'épiderme racinaire et conditionnent la spécificité d'hôte.



**Figure 9** : Dialogue moléculaire *Rhizobium*-Légumineuse (Lindström et al., 2010).

**•Mode d'infection**

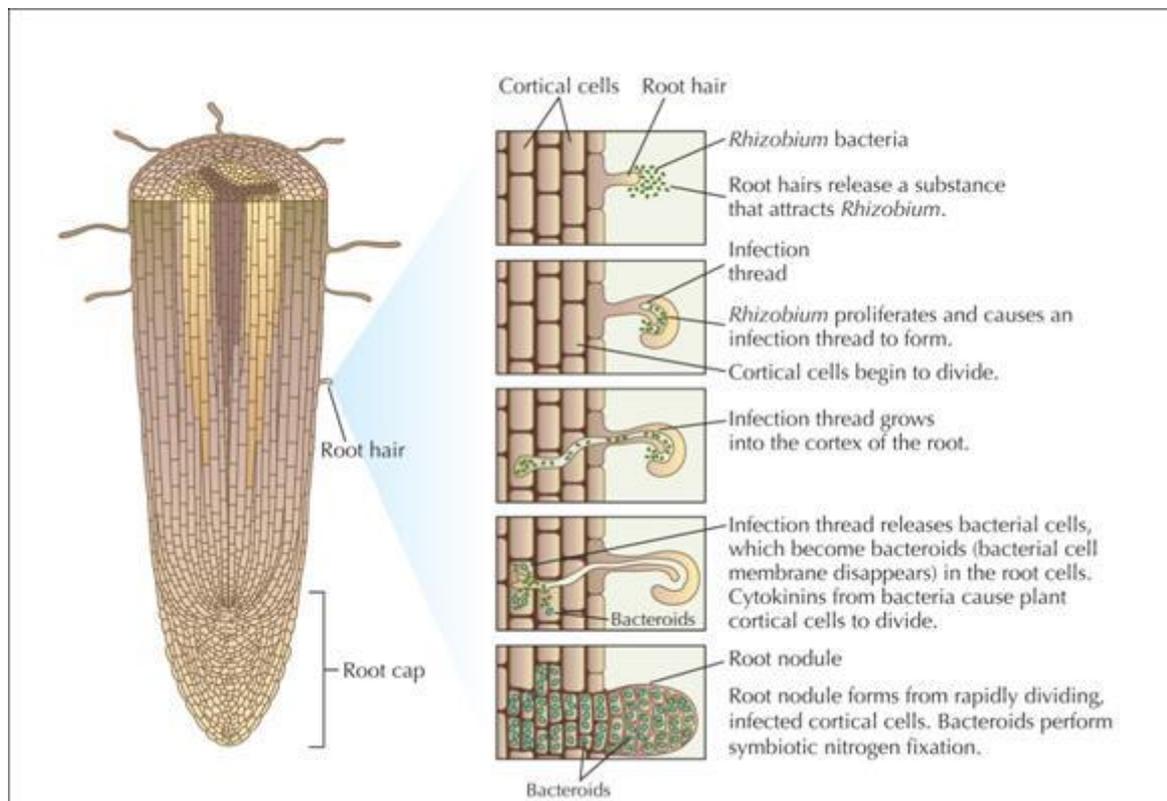
Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection intracellulaire où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers des poils absorbants, et a été observé chez des légumineuses tempérées (exemples : *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum*) et certaines légumineuses tropicales et subtropicales (exemples : *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*) (Gage, 2004).

En réponse aux facteurs Nod bactériens (lipochitoooligosaccharides produits par la bactérie via les gènes *nod* de nodulation), l'infection se caractérise par une réorientation de la croissance des poils absorbants conduisant à la formation d'une courbure (Root Hair Curling : RHC) en forme de « crosse de berger ». Au cœur de cette crosse, un espace clos est formé, à l'intérieur duquel les rhizobiums sont piégés et prolifèrent. Les bactéries induisent alors la formation d'un cordon d'infection intracellulaire par invagination de la paroi végétale, cordon au sein duquel les bactéries se multiplient. Le cordon progresse vers le site définitif de libération des bactéries : le primordium nodulaire qui devient ensuite le lobe nodulaire. Il existe aussi un mécanisme d'infection intercellulaire ou entrée par fissure « crack entry », observé par exemple chez *Sesbania. rostrata* (Pawlowski et Bisseling, 1996) et *Aeschynomene indica* et *Aeschynomene afraspera* (Bonaldi et al., 2011). Dans ce cas, les bactéries profitent de fissures formées lors de l'émergence des racines latérales et colonisent les espaces intercellulaires en formant des poches d'infection. Les rhizobiums progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996).

**•Développement de nodules**

En parallèle de la progression d'infection, l'organogenèse nodulaire se met en place. Le primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, se différencie en nodule mature (Brewin, 1991 ; Trevaskis et al., 2002). Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale (Oke et Long 1999 ; Day et al., 2001 ; Brewin, 2004 ; Gage, 2004). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires (Udvardi et Day, 1997). Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes, formes fixatrices d'azote

adaptées aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule (Mergaert et al., 2006). (figure 10).



**Figure 10 :** Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante légumineuse (laboratoire press, 2007).

Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués : déterminés et indéterminés suivant le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex et la persistance ou non du méristème. (Hirsch, 1992 ; Pawlowski et Bisseling, 1996).

Chez les espèces tropicales (exemple : *Glycine*, *Phaseolus*...), les nodules de types déterminés sont initiés à partir du cortex externe dont la persistance du méristème est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Ce processus se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules (tableau 2).

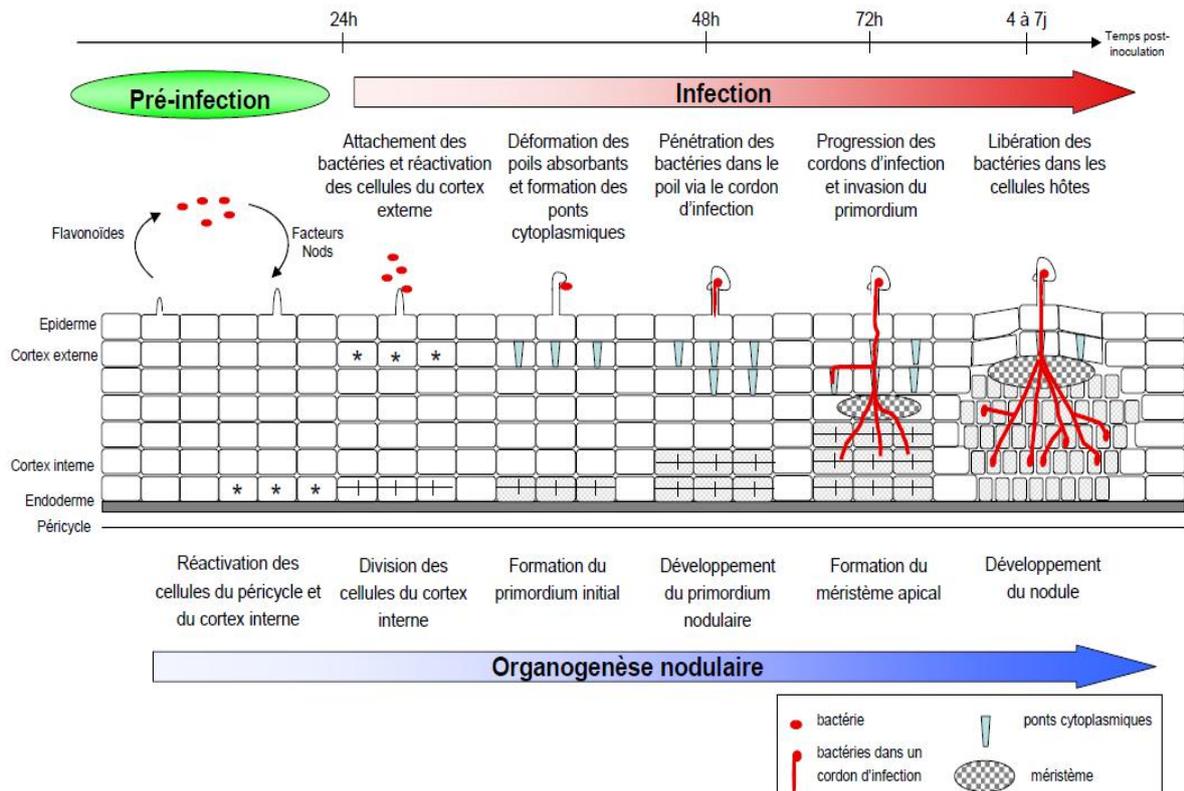
Les nodules indéterminés caractéristiques de la sous-famille des *Mimosoideae* et de nombreuses espèces de *Papilionoideae* (exemple : *Lentille*, *Pisum*, *Trifolium*, *Vicia*...) (Sprent, 2007) sont formés à partir du cortex interne et ont un méristème apical persistant qui

produit en continue de nouvelles cellules (tableau 2) , ce qui se traduit par des nodules de forme allongée et organisés en zones histologiquement différentes (Hirsch, 1992).

Ainsi le nodule est divisé en quatre zones distinctes (zone I à IV) . La forme et la structure du nodule sont corrélées à l'origine taxonomique de la plante hôte (Spren, 2007).(figure 11).

Type de nodosité	Déterminée	Indéterminée
Exemples	<i>Glycine, Phaseolus, Vigna, Lotus</i>	<i>Acacia, Medicago, Trifolium, Pisum</i>
Cordon d'infection	Etroit	large
Site d'initiation du primordium nodulaire	cortex externe	cortex interne
Méristème nodulaire	activité limitée	apical et persistant
Croissance nodulaire	division cellulaire	expansion cellulaire
Morphologie	circulaire	allongée,
Cellules infectées matures	non vacuolisées	ramifiée petites vacuoles
Forme d'exportation de l'azote fixé	uréides (allantoïne ...)	acides aminés (asparagine, glutamine)

**Tableau 2 :** Différences principales entre les nodules de type déterminé et indéterminé (Sutton, 1983 ; Hirsch,1992).



**Figure 11 :** Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé (*M. truncatula*) (Patriarca *et al.*, 2004).

## 5. Facteurs influencent la Symbiose *Rhizobium*-légumineuses

### 5.1. Le pH du sol

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994). L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobiums et engendre par conséquent une diminution de la nodulation (Munns, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994).

### **5.2.L'eau :**

Le déficit hydrique provoque une diminution de pois frais, du nombre des nodules et de l'ARA (CHEBOUTI et ABDELGHERFI, 2000). OUNANE (1995), démontrent que les gros nodules sont capables de résister mieux au déficit hydrique et maintenir une bonne activité nitrogénase que les petites nodules et cela due à la présence d'un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit Leur déshydratation .

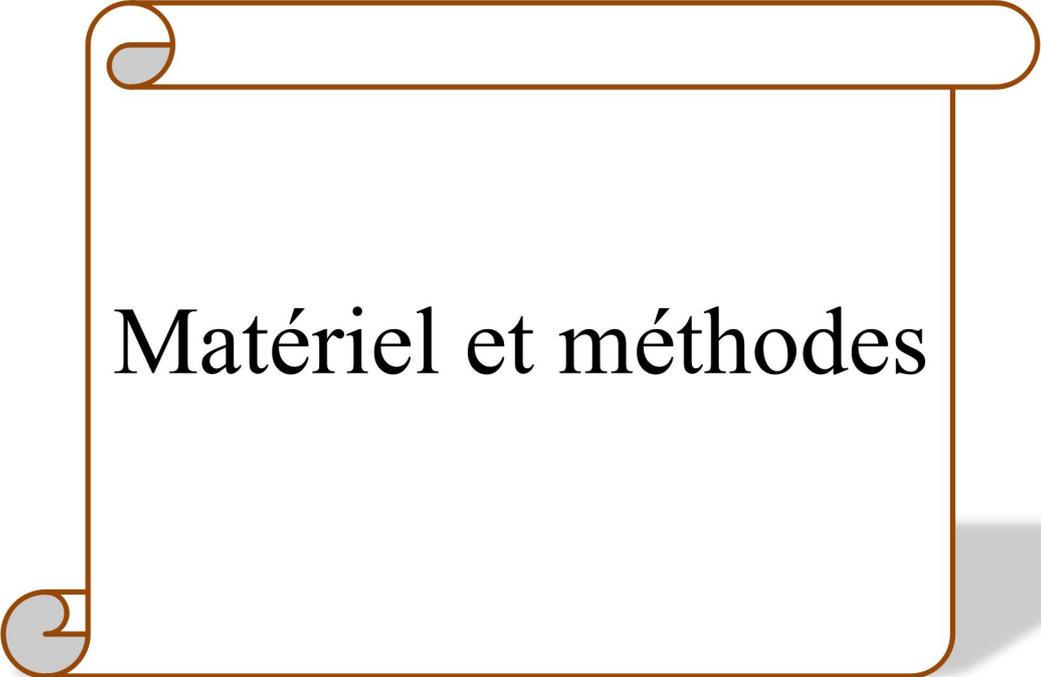
### **5.3. La température :**

D'après SAXENA et SINGH (1987) et WERY (1987), in AZIEZ et MAHKTOUB (1995) , les extrêmes de températures affectent sérieusement la fixation d'azote et l'infection racinaire. Selon une expérience faite sur l'effet de température sur la fixation et l'assimilation de l'azote chez le pois chiche, a montrée que l'activité nitrates réductase, l'activité réductrice d'acétylène ainsi que la teneur en nitrate du pois chiche sont sensible à l'action directe de température. En effet des plants de pois chiche soumis à des températures extrêmes développent une ARA faible, par contre des températures moyennes de l'ordre de 25°C semblent favoriser cette activité (KICHOU et SAHRAOU, 2001).

### **5.4. Le stress salin**

En symbiose, le rhizobium est plus résistant à la salinité que son partenaire végétal (Zahran, 2001). La tolérance de la plante hôte constitue donc un facteur déterminant (Soussi et al., 1998).

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la FSN (Fixation Symbiotique de l'Azote) est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao et al., 2002). Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong et al., 2006).



# Matériel et méthodes

## 1. Objectif de l'essai

L'objectif de notre essai est d'étudier les bactéries nodulant les racines de la lentille ,plusieurs génotypes ont été semés au niveau de la Ferme de Démonstration et de la Production de Semences (FDPS) de Oued Smar wilaya d'Alger ; afin de sélectionner les génotypes qui répondent et s'adaptent aux facteurs environnementaux (climatiques et édaphiques).

## 2. Présentation de la région d'étude

### 2.1. Localisation de l'essai

L'essai a été réalisé en plein champ au niveau de la Ferme de El-Harrach Alger .Le site expérimental est situé aux coordonnées géographiques Les coordonnées géographiques sont les suivantes : 3°08' de longitude est 36°43' de latitude nord. Elle se trouve à 24 m au-dessus du niveau de la mer ; entres les isohyètes 600 mm et 700 mm. Elle appartient à l'étage bioclimatique subhumide à hiver doux.

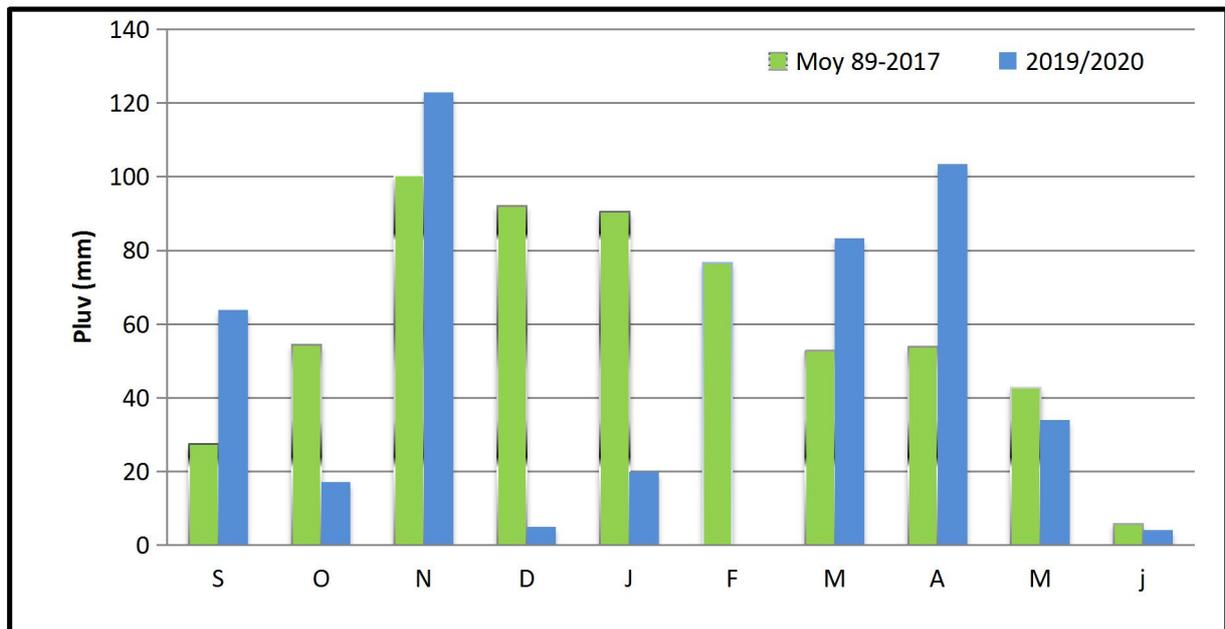


**Figure 12 :** Situation géographique de l'FDPS de l'ITGC de Oued Smar (Google Earth).

## 2.2. Caractéristiques climatiques

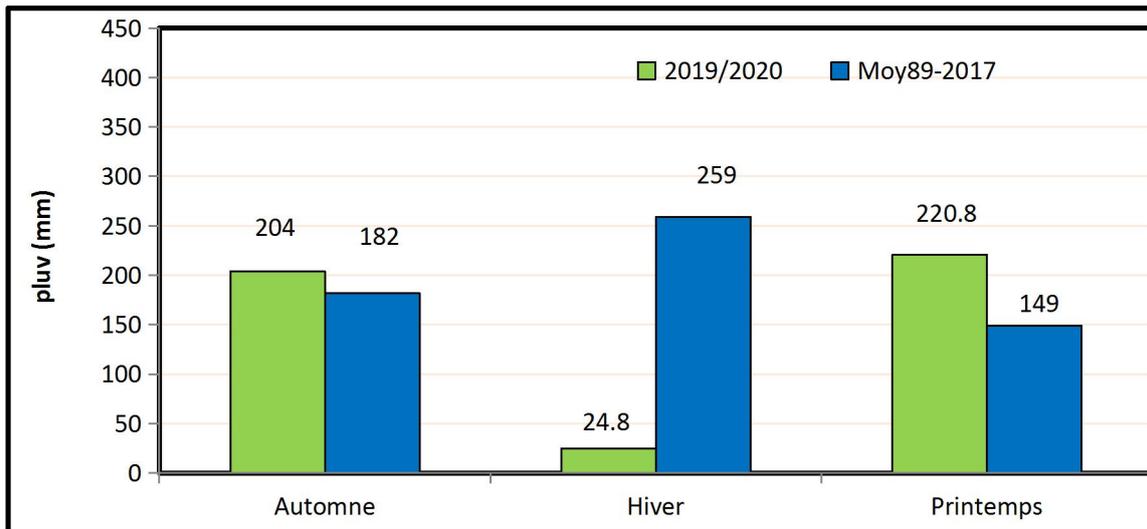
Mois	Pluviométrie (mm)			Total mensuel 2019/2020 (mm)	Moyennes mensuelles 1989/2017 (mm)
	décade 1	décade 2	décade 3		
Sept	00	63.8	00	63.8	27,55
Oct	04	00	13.2	17.2	54,39
Nov	55	51	17	123	100,48
Dec	00	4.9	00	4.9	92,08
Jan	00	19.6	0.3	19.9	90,65
Fev	00	00	00	00	76,68
Mars	19.2	9.2	55	83.4	52,74
Avril	20	55	28.4	103.4	53,83
Mai	34	00	00	34	42,74
Juin	4.1	00	00	4.1	5,82
Total				453.7	596,96

**Tableau 3 :** Valeurs pluviométriques mensuelles de la campagne 2019/2020 enregistrées à Oued-Smar Comparées à la moyenne de 89/2017.



**Graph 1 :** Hauteurs pluviométriques mensuelles enregistrées à Oued-Smar durant la campagne 2019-2020 Comparées à une moyenne de 28 ans (1989-2017).

Le cumul pluviométrique enregistré au niveau de la station d'Oued Smar durant la campagne 2019/2020 s'élève à 453.7 mm avec un stress hydrique de 143 mm par rapport à la moyenne de la période 1989 à 2017.



**Graph 2 :** la pluviométries mensuelles de la campagne 2019/2020 enregistrées à Oued-Smar Comparées à la moyenne de 89/2017 par saison.

On a noté durant le mois d'Octobre un stress hydrique ayant pour conséquence un retard de travail du sol. Par la suite, les pluies enregistrées durant le mois de Novembre ont été suffisantes afin de réaliser les labours. Le travail du sol a cependant été effectué.

Après les semis, nous avons noté une absence quasi totale de pluies ce qui a retardé la levée et affecté ainsi le paramètre nombre de plants levés par m

Cette campagne a été caractérisée par un hiver particulièrement sec et doux. Nous y avons enregistré uniquement 24 mm de pluie durant les trois mois de décembre, janvier et février. Par ailleurs, nous avons noté des précipitations à partir de mois de mars qui ont été particulièrement bénéfiques aux cultures des semis précoces mais également au développement des semis tardifs.

### 2.3. Analyses physico-chimiques du sol

Avant la mise en place de l'essai, et afin de connaître les caractéristiques Physico-chimiques du sol, un prélèvement a été fait à l'aide d'une tarière, à une Profondeur de 0 à 40 cm sur cinq emplacements répartis sur la totalité de la parcelle d'essai. Tous les échantillons ont été mélangés afin de constituer un seul échantillon homogène. Les échantillons ont été analysés physico-chimiquement. Elles ont porté sur les propriétés suivantes :

<b>Analyses</b>	<b>Eléments</b>	<b>Matériel et méthodes</b>
<b>Granulométrie</b>	Argile %	Pipette de Robinson
	Limons %	
	Sable %	
<b>Chimiques</b>	pH eau	pH mètre
	pH kcl	
	Conductivité électrique	Conductimètre
	Matière organique	La méthode d'Anne
	Carbone	
	Calcaire total	Calcimètre de Bernard
	Calcaire actif	Méthode de Drovinean
	Azote total	Méthode de Kjeldahl
	Phosphore assimilable	Méthode d'Olsen

**Tableau 4** : Analyses physico-chimique du sol.

### 3. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est composé de deux pépinières ; chaque pépinière contient 16 (seize) génotypes de lentille. On a obtenu c'est génotype d

Pépinière N° 1 : LAT

Pépinière N° 2 : LDTN

#### 3.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental adopté est le bloc aléatoire complet. Chaque bloc est structuré en 32 lignes (micro-parcelles élémentaires chaque génotype est représenté par deux lignes avec un écartement de 30 cm). Les micro-parcelles représentent les 16 génotypes. Chaque génotype est répété deux fois (deux bloc). La dimension de ligne est de 2m de long avec un écartement de 30 cm.

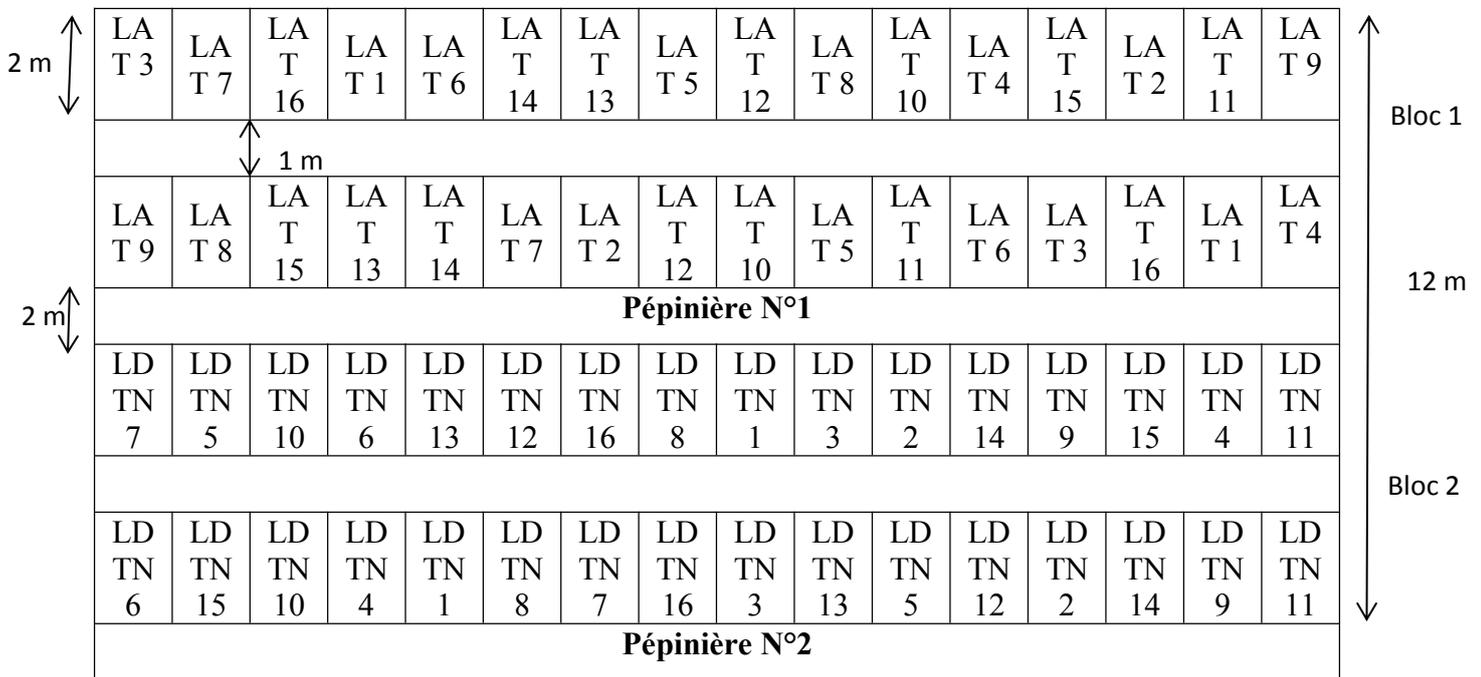


Figure 13 : Dispositif expérimentale de l’essai

#### 4. Gestion de l’essai

##### 4.1. Travail du sol

Les opérations culturales effectuées sont les suivantes :

- Labour : avec une charrue à socs.
- Façons superficielles : croissage et recroissage avec passage d’un cover crop.

##### 4.2. Semis

Le semis a été effectué le 26 janvier 2020 manuellement. Avec une densité de 150 plants par ligne c’est-à-dire pour chaque génotype on a semis 600 graines.



**Figure 14:** photo de semis des génotypes de la lentille manuellement au niveau de la FDPS de Oued Smar.

### **4.3. Entretien de la culture**

#### **4.3.1. Traitements appliqués**

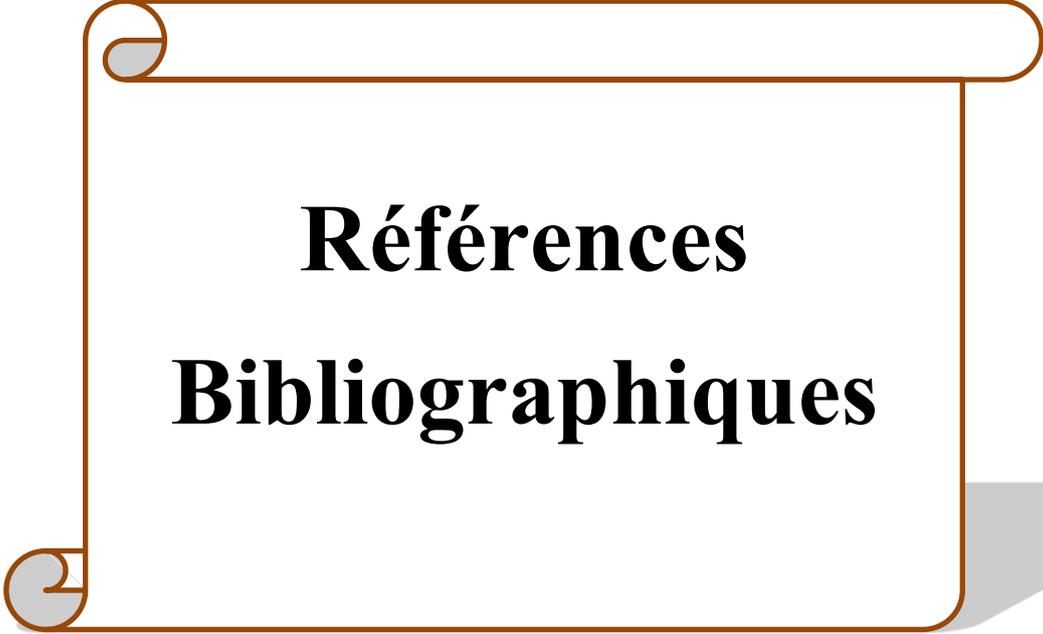
- Désherbage chimique avant semi par l'utilisation d'un herbicide polyvalent (challenge) de contact (anti dicotylédones et contre certains graminées) à raison de 3 l/ha.

#### **4.3.2. Désherbage**

Le désherbage a été réalisé manuellement sur la totalité de l'essai expérimental (les micro-parcelles et entre les lignes), pour détruire les mauvaises herbes et éviter la probabilité d'évolution des parasites et la concurrence d'utilisation des éléments nutritifs.

### **4.4. Paramètres étudiés**

- Isolement des bactéries des nodules.
- Prélèvement des nodules racinaires.
- Stérilisation des nodules.
- Extraction des bactéries des nodules.
- Purification des colonies.
- Conservation des isolats.
- Le test de nodulation .
- Caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des isolats bactérienne .



**Références**  
**Bibliographiques**

**Ahlawat, I.P.S (2012).** Agronomie – rabi crops, Lentill .Division of Agronomy Indian Agricultural Research Institute , New Delhi – 110 012 Agronomy.

**Ait Abdallah. (2011)** .Culture et cout de production des grandes cultures.P84. ISBN : 978-9961-881-18-7.

**Bejiga G. (2006).** Lens culinaris Medik. Fiche de Protabase. Brink, M. and Belay G. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical African/ Ressources végétales de l’Afrique tropicale), Wageniniges. Pays Bas.

**Boivin C, Lortet G, Larquin J, BA S, Méar N, Ferro M, de Lajudie P, Promé JC et Dreyfus B. (1998)** : Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums : application aux souches d’Acacia et de Sesbania du Sénégal. In Acacia au Sénégal. Edition : Orstom. France. pp. 378-386.

**Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, Goormachtig S, Giraud E. 2011.** Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS285 : The Nod-Dependent Versus the Nod-Independent Symbiotic Interaction. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 24: 1359–1371.

**Bordeleau L M et D. Prevost. (1994).** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*.161. pp. 115-124.

**Brencic A, Winans SC. 2005.** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 155-194.

**Brewin NJ. 1991.** Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 7: 191–226.

- Brink M, Belay G. 2006.** Céréales et légumes secs, ressources végétales de l'Afrique tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P:102.
- Cooper JE. 2004.** Multiple responses of rhizobia to flflavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research.* 41: 1–62.
- Cooper JE. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology.* 103: 1355–1365.
- Cullimore, J V, Ranjeva R et Bono J J. (2001).** Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6.pp.24- 30.
- Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J et Boivin C. (2001).** Nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimia Polonia Mini review.* 48 (2).pp.359–365.
- Denarié J, Debelle F, Prome JC. 1996.** *Rhizobium* lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry.* 65: 503–535.
- Dolisi, G ., 2010.** Rhizobium, une bactérie fixatrice d'azote BioTop Nodosités de légumineuse.
- Dommergues Y., Duhoux E. et Diem H.G, 1999** - Les arbres fixateurs d'azote. Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. 499 p. France: CIRAD, Editions Espaces, FAO, IRD, Montpellier, France.
- Duhoux E, Nicole M. 2004.** Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Eds. IRD.Montpellier. pp :1-18.

- FAO. (2010).** Faostat, Fao Statistical Database. Retrieved from <http://www.fao.org>.
- Gage DJ. 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 280–300.
- Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991.** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*41.pp. 582-587.
- Gramma B S. (2008).** Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Constantine. , faculté des sciences de la nature et de la vie.93p.
- Hawtin, G. C., Singh, K. B., & Saxena, M. C.(1980).** Some recent developments in the understanding and improvement of Cicer and Lens. In R. J. Summerfield & A. H. Bunting (Eds.), *Advances In Legume Science*. P: 613-623.
- Hirsch AM. 1992.** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*. 122: 211–237.
- Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010.** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*. 161: 453–463.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol* 17: 458–466.
- McNeill, A. M., Pilbean, C. J., Harris, H. C., & Swift, R. S.(1996).** Seasonal variation in the suitability of different methods for estimating biological nitrogen fixation by grain

legumes under rain fed conditions. Australian Journal of Agricultural Research, 47, 1061-1073.

**Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A, Kondorosi E. 2006.** Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103: 5230–5235.

**Munns D. N. 1977.** Soil acidity and related factors. In J. M. Vincent, A. S. Whitney and J. Bose (eds.) pp. 211-236.

**Oke V, Long SR. 1999.** Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Current Opinion in Microbiology. 2: 641-646.

**Omar Idrissi, Houasli Chafika et Nasserlhaq Nsarellah. (2013).** Comparaison de lignées avancées de lentille sous stress hydrique durant la phase de floraison et formation des gousses. Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, N° 08. P : 53- 61.

**Ozdemir, S. (2002).** Grain legume crops. Hasad Publishing, Istanbul, Turkey.

**Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S. et Iaccarino M, 2004 -** Organogenesis of legume root nodules. Int Rev Cytol. 234: 201-62.

**Pawlowski K, Bisseling T. 1996.** Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? Plant Cell. 8: 1899–1913.

**Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W. and Borthakur D. 2006.** Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in *Sinorhizobium sp.* Strain BL3. Symbiosis 41: 47-51.

- Rao DLN, Giller K.E., Yeo A.R. and Flowers T.J. 2002.** The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* 89: 563- 570.
- Saskatchewan PG. 2000.** Pulse production manual. Saskatchewan Pulse.
- Schawartz D. and Langham. (2012).** Grows stage of lentil. Disponible sur internet : <http://legume.ipmpipe.org>.
- Sebihi FZ. (2008).** Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. 121p.
- Somasegaran P, Hoben HJ.1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.
- Soussi M., Ocana A. and Lluch C. 1998.** Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337.
- Sprent J. 2007 .** Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist.* 174: 11–25.
- Street K. (2008).** Directives pour la régénération : lentille. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. P: 10.
- Taylor LP, Grotewold E. 2005.** Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology.* 8: 317–323.
- Terefework Z. (2002).** Diversity and phylogeny of Rhizobiumgalegae, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Academic Dessertation in Microbiology. University of Helsinki. ISSN. pp 1239-9469.
- Tortora G.J, Funk B R , Case C L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du

Renouveau Pédagogique. *Inc.* pp. 826-830.

**Udvardi MK, Day DA. 1997.** Metabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 48: 493–523.

**Vandenberg A, Slinkard AE. 1990.** Genetics of seed coats color and pattern in lentil. *Journal of Heredity.* 81: 484–488.

**Vincent JM .1970.** The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

**Wenger, G.(2004).** La vogue des légumineuses et autre légumes à cosse. Séminaire professionnelle de la fédération de producteur suisse de lait PSL pour les enseignants en économie familiale.

**Zahran HH. 2001.** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology.* 91: 143–153.

**Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004.** Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology.* 27: 380–395.

**Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC. 2005.** Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology.* 137: 1189–1196.

### Références électroniques:

<https://www.researchgate.net/publication/32972120>

<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobiums>

(Google Earth)

Eartheclipse.com. (n.d.). The nitrogen cycle.

Visionlearning. (2009). United States Environmental Protection Agency.

aquaportal. (n.d.). Définition du cycle de l'azote .