

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers**

**Département de Biologie**

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat- es- Sciences  
en biologie moléculaire et cellulaire**

**Thème**

**Effets de certains inducteurs de gènes nod (composés phénoliques)  
sur la croissance de *Rhizobium* en symbiose avec *Vicia faba*  
Caractérisation et lutte biologique**

**Présenté par:**

**M<sup>r</sup> LAKHAL Abdelhafid**

**Devant le Jury composé de:**

Présidente : Mme MERZOUK H. : Dr. Professeur au département de Biologie Univ. De Tlemcen

Promoteur : Mr BENSOLTANE S. A. : Dr. Professeur au département de Biologie, Univ. D'Oran

Co promotrice: Mme ATIK .F. : Dr. Professeur au département de Biologie Univ. de Tlemcen

Examineurs : Mr B ELKHOUDJA N.E : Dr. Professeur au département de Biologie Univ. d'Oran

: Mr ABDELOUAHID D.E : Dr. Professeur au département de Biologie Univ. de Tlemcen

: Mr DJIBAOUI R. : Dr. M. de conf. au département de Biologie Univ. de Mostaganem

**Année universitaire 2010-2011**

## إهداء

فيى بهاء ما يتبقى من لحظات  
التعب و المثابرة و ما يرسخ  
من ذكريات العمل الدؤوب  
و التضحية بأوقات  
اللهم و التنزه اهدي هذا  
العمل المتواضع إلى  
أمي و إخوتي و أهلي  
و كل معارفني

لعمل عبد العفيف

## Remerciements

*La réalisation de cette thèse est l'aboutissement d'un parcours académique, long et laborieux, parfois semé d'embûches. Au cours duquel malgré les tribulations, les moments de doutes inhérents à tout apprentissage, j'ai toujours été convaincu de vivre des moments inoubliables.*

*C'est un devoir que de remercier au début d'un tel travail tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible et agréable. C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse. Je désire alors leur exprimer ma profonde gratitude.*

*Tout d'abord, je souhaiterais remercier le plus sincèrement mon directeur de thèse, Le Professeur Docteur BENSOLTANE Ahmed. Département de biologie -Université d'Oran. Il été là pour me pousser vers la carrière scientifique. Ce fut pour moi un réel plaisir d'être dirigé par un tel promoteur avec un enthousiasme motivant. Grâce à ses conseils, j'ai pu réaliser ce travail et j'espère avoir été à la hauteur de ses attentes. Merci d'avoir en toutes occasions pris le temps de m'écouter et de me comprendre. Pour tout cela et encore bien pour ton humanisme et ta bonté, Merci! J'ai bien compris que notre entente se construisait également par le respect mutuel. Chacune des séances de travail ensemble reste pour moi d'excellents souvenirs. Nous avons dépassé rapidement le cadre des relations académiques pour devenir de véritables amis. Que nous resterons, j'espère le plus longtemps possible.*

*J'aimerais également, remercier ma co-directrice le Professeur Docteur Mme. Atik Fewzia - département de biologie -Université de Tlemcen, à qui j'exprime toute ma gratitude pour l'excellent encadrement fourni, ses conseils judicieux, sa disponibilité et sa patience, malgré les nombreuses difficultés. Ainsi que, pour sa permission d'utiliser son laboratoire de recherche. Je retiens en mémoire son sérieux et son dévouement pour mon travail. Mme Atik Fewzia reste pour moi et pour toujours une personne d'une qualité scientifique très rare. Elle m'a fourni des dizaines de publications qui font la base -plus spécialement -de la partie phytochimique de cette*



*thèse pour laquelle elle insistait sur un aboutissement honorable.*

*Je suis très reconnaissant envers Mme. Merzouk hafida, le Professeur Docteur au département de biologie -Université de Tlemcen d'avoir accepté la présidence de ce jury malgré ses nombreuses occupations. Qu'elle trouve ici ma profonde gratitude.*

*J'ai tout le plaisir et l'honneur de la présence de Mr. le Professeur Docteur Belkhodja Nour-eddine département de biologie -Université d'Oran. Je le remercie d'avoir accepté l'examen de mon travail, je suis sûr que sa présence apportera énormément à cette thèse.*

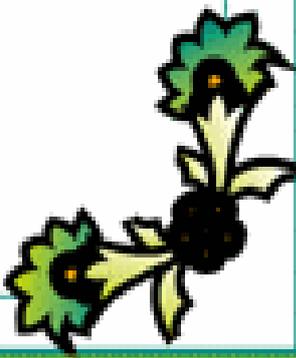
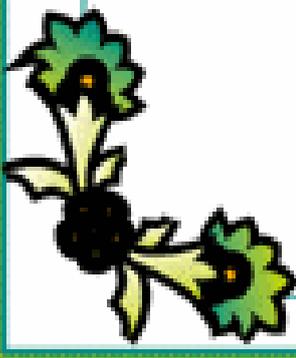
*Je remercie également Mr. Le professeur Docteur Abdelouahid Djamel eddine - département de Biologie -Université de Tlemcen de m'avoir honoré par sa participation à l'examen de mon travail.*

*Mes remerciements vont aussi à Mr. Djibaoui Rachid. Maître de conférences au département de biologie -Université de Mostaganem d'avoir accepté d'être parmi ce jury.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude envers : Mr Belmansour Djamel, Mr Mahjoub Rafik et Mme Belyaagoubi Nabila pour leurs aides précieuses.*

*Je n'oublie pas de remercier Mme. Belarbi vice doyen de la post graduation pour ses encouragements permanents.*

*Je réserve un remerciement spécial à ma très chère maman à qui, j'ai eu la possibilité de faire des études supérieures. Ces quelques lignes ne suffisent pas, mais je tiens à lui exprimer ma reconnaissance éternelle. Ces travaux de recherche n'auraient jamais vu le jour sans l'appui moral et intellectuel des membres de ma famille et mes amis.*



## خلاصة

تم اختبار 20 عزلة من بكتيريا الريزوبيوم القادرة على تكوين عقد جذرية في نبات *Vicia faba* والتي تم عزلها على أطباق صلبة من وسط YEM. وتم تعريفها على المستوى المورفولوجي و الفزيولوجي وكذا قدرتها على التعامل الأيضي لبعض السكريات و التي أظهرت تنوعا في استعمال مصدر الكربون من طرف هذه البكتيريا مع أفضلية عامة لاستعمال **Fructose ، Xylose ، Mannitol** و **Saccharose**. تمت دراسة قابليتها للنمو على أوساط ذات حموضة عالية و أوساط قاعدية (من 4 إلى 9). كما تم اختبار نموها تحت تأثير تواجد تراكيز عالية من **NaCl** و كيفية استجابتها لدرجات حرارة بلغت في أقصاها 52 درجة مئوية، كما أظهرت بعضها قدرتها على مقاومة بعض المضادات الحيوية.. وتم مراقبة نشاط مضادات الميكروبات في تثبيط نمو (07) فطريات: **Penicillium ، Fusarium oxysporum ، Alternaria ، sp ، Aspergillus flavus ، Rhizopus ، Trichoderma A flavus**. أظهرت النتائج الفعل المثبط لمرشحات الريزوبيوم على نمو الفطريات. 50 % من هذه المواد قادرة على منع نمو السلالات الفطرية المستخدمة مثل **Fusarium oxysporum** تم تثبيط نموها من طرف كل مرشحات الريزوبيوم المختبرة. كما تم اختبار نموها تحت تأثير ست مركبات فينولية حيث تبين أن بعض هزة المركبات يختلف تأثيرها من عزلة إلى أخرى حيث أن مركبات مثل **le resorcinol** و **pyrocathécol** و **naringine** حفزت نمو أكثر من 70% من الرزوبيوم , كما ان بعض هذه المركبات غيرت شكل المستعمرات ما يدل على إحداث طفورات. إن الاستجابة الفزيولوجية للبكتيريا لهذه العوامل متفرقة أو متجمعة أظهرت مدى أهميتها و الحاجة إليها في المجال البيوتكنولوجي نظرا لقدرتها على تخصيب التربة المفتقرة إلى عنصر الأزوت و تحمل الظروف الفزيوكيميائية القاهرة

الكلمات المفتاحية: **Vicia faba** ، الريزوبيوم ، ، مضادات حيوية ، تثبيط، الفطريات المسببة للأمراض النباتية ، المركبات الفينولية

## Résumé

Vingt souches de *Rhizobium sp.*, -isolées des nodules de *Vicia faba*, dans la région de Tlemcen (nord ouest de l'Algérie), sont caractérisées phénotypiquement. Elles acidifient le milieu de manière identique, ce qui laisse à penser qu'elles sont de même espèce. Le métabolisme des glucides indique la variabilité dans la source du carbone, une préférence commune pour le mannitol, le xylose, le fructose et la saccharose. La majorité dégradent le maltose et l'amidon et pouvaient se développer à pH 9, mais ne peuvent pas le faire sur YEM à pH 4, 4.5 et 5. Aucune souche ne s'est développée à 47 et à 52° C. De même elles peuvent se développer sur le milieu à 0.3 et 0.6 M de NaCl et tolèrent 0.8 M de NaCl, leur résistance aux antibiotiques, a indiqué la diversité de multiresistance, alors toutes résistent à l'Amoxicilline, à Cefotaxime, à l'Oxacilline et la pénicilline. Tous les isolats peuvent produire des polysaccharides sur YEM. L'activité antimicrobienne de chaque souche a été examinée *in vitro* sur: *A. flavus*, *A. Niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria*, *Rhizopus stolonifère*, *Penicillium sp.* et *Trichoderma*. Ils ont une large sensibilité aux rhizobiums. L'inhibition des champignons a été évaluée par zone d'inhibition autour de la colonie de rhizobium. *Fusarium oxysporum* a été inhibé par 60% des rhizobiums, mais il résiste à toutes les souches RS. Tous les champignons examinés ont été inhibés par la majorité des rhizobiums ; cependant, les souches de rhizobium de Maghnia et le Zenata donnent les inhibitions les plus importantes (42mm). RM1a une activité antimicrobienne sur tous les champignons examinés. RS1 et RS2 n'ont montré aucun effet antagonique. si les inoculum de rhizobium sont ajoutés, après 2 jours d'incubation des champignons sur le de YEM, 4/5 d'entre eux sont suppressifs, mais seulement 1/5 le sont, si les rhizobiums sont ensemencés après 3 jours d'incubation des champignons. Après 4 jours d'incubation des champignons aucun effet antagonique n'a été observé. La naringine et le pyrocathécol activent 70% des souches et le résorcinol 60 %; phloroglucinol et hydroquinone semblent être des inhibiteurs pour plus de 60% d'entre eux, l'effet de quelques composés phénoliques sur les souches, se révèle parfois par un polymorphisme des colonies (signe de mutation). De telles souches sont recherchées en biotechnologie en raison de leur compétitivité et leur pouvoir à fertiliser le sol appauvri en azote et de supporter des conditions de stress.

**Mots clés: *Rhizobium*; *Vicia faba*; caractérisation; Antibiotiques; antagonisme; Composés phénoliques**

## Abstract

Twenty strains of *Rhizobium sp.*, -isolated from the nodules of *Vicia faba* roots in Tlemcen areas, west of Algeria, have been characterized in terms phenotypic. These strains have an acidification manner so identical that we think they are from the same species. The metabolism of carbohydrates reveals variability in the source of carbon used by them with a common preference for mannitol, xylose, fructose and saccharose. Majority degrade maltose) and starch; and were able to grow at pH 9, but can not on YEM pH 4, 4.5 and 5. No strain has grown to 47 and 52 ° C. Similarly they can grow on the medium containing 0.3 and 0.6 M NaCl and tolerate the concentration of 0.8 M NaCl, their resistance to antibiotics, have revealed diversity within them and have multiresistance, then all of them resist to Amoxicillin, Cefotaxin, and Oxacillin, Penicillin. All isolates were able to product polysaccharides on YEM Agar. Antimicrobial activity of each strain was tested *in vitro* on: *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria*, *Rhizopus stolonifère*, *Penicillium sp.* and *Trichoderma*. Under identical conditions on the same medium have a wide sensibility to *Rhizobium spp.* Inhibition of fungi was evaluated by inhibition area around *Rhizobium* colony. *Fusarium oxysporum* was inhibited by **60%** of *Rhizobium* isolates, but it resists to all of RS strains. All of the tested fungi were inhibited by the majority of *Rhizobium* strains; however, *Rhizobium* Maghnia strains and Zenata give the most important inhibitions (42mm). RM1strains have an antimicrobial activity on all of the tested fungi. RS1 and RS2 showed no antagonistic effects. After 2 days of fungi incubation on solid YEM medium , if inoculums of *Rhizobium* were add, 4/5 of them were suppressive, only 1/5 part of them were suppressive, if it will be added after 3 days of fungi incubation. After 4 days of fungi incubation no antagonistic effects were showed. Such strains are searched in biotechnology because of their competitiveness and their power to fertilize the soil depleted in nitrogen and to bear the physicochemical conditions stress. The naringine and the pyrocathécol activate 70% of the strains and resorcinol 60 % phloroglucinol and hydroquinone seem to be inhibitors for more than 60% of them, the effect of some phenolic compounds on the strains, appeared sometimes by a polymorphism of the colonies (sign of mutation).

**Key words:** *Rhizobium*; *Vicia faba*; characterisation; Antibiotics; antagonism; Phenolic compounds

# Sommaire

<b>Introduction générale</b>	6
<b>synthèse bibliographique</b>	
<b>Les légumineuses</b>	
1. Taxonomie des légumineuses	
1.2. La fève <i>Vicia faba</i> L.	
3. Qualité nutritionnelle et composition de la graine de fève	7
1.4. La composition phénolique de la graine de la fève	8
1.5. Intérêt des composés phénoliques sur la santé humaine	
1.6. Intérêt physiologique des composés phénoliques	9
1.7. Effets des composés phénoliques sur le <i>Rhizobium</i>	10
1.8. Classification des composés phénoliques	11
1.8.2. Flavonoïdes	12
1.8.3. Les tannins	
1.8.4. Les lignines	
9. La composition phénolique de la graine de la fève	13
9.1. Les flavonoïdes chez <i>Vicia faba</i>	
9.2. Les tannins chez <i>Vicia faba</i>	14
<b>La fixation d'azote</b>	
1. La fixation symbiotique de l'azote	
2. La symbiose <i>Rhizobium</i> - légumineuses	15
3. Les gènes Nod	
4. Induction des gènes de nodulation	16
5. Les facteurs Nod	17
6. Le processus de la nodulation	18
6.1. Les étapes de la nodulation	
6.2. Les paramètres affectant la réussite de la nodulation	20
<b>Les <i>Rhizobium</i></b>	
1. Morphologie et caractéristiques	21
1.1. La nutrition azotée des <i>Rhizobium</i>	22
1.2. Production de polysaccharides <i>Rhizobium</i>	23
1.2.1 Les exo polysaccharides (E.P.S)	
1.2.2. Les polysaccharides capsulaires (KPS)	
1.2.3 Les lipopolysaccharides (LPS)	24
3.2. Les avancées de la Taxonomie rhizobiums	25
3.2.2. rejet du concept de groupe d'inoculation croisée	27
3.3. Les genres des <i>Rhizobium</i>	
3.3.1. le genre <i>Bradyrhizobium</i>	
3.3.2 le genre <i>Azorhizobium</i>	29
3.3.3. Le genre <i>Sinorhizobium</i>	30
3.3.4. Le genre <i>Methylobacterium</i>	31
3.3.5. Le genre <i>Phyllobacterium</i>	

3.3.6. Le genre <i>Herbaspirillum</i>	
3.3.7. Le genre <i>Cupriavidus</i>	
3.3.8. Le genre <i>Ochrobactrum</i>	
3.3.9. Le genre <i>Burkholderia</i>	
3.3.10. Le genre <i>Devosia</i>	32
3.3.11. Le genre <i>Mesorhizobium</i>	
3.4. Exemples de bactéries et leurs plantes hôtes	
4. Dépollution et lutte biologique	33
4.1. Lutte biologique contre les mauvaises herbes et les parasites	34
4.2. Développement de la lutte biologique par les bactéries.	
4.3. <i>Rhizobium</i> et lutte biologique	
5. Compétences biotechnologiques du <i>Rhizobium</i>	35
5.1. Antagonisme entre <i>Rhizobium</i> et flore microbienne	
5.1.1. Antibioses	
5.1.2. Hydrolases	
5.1.3. Compétition	36
5.1.3.1 Sidérophores et compétition	
5.1.3.2. Inhibition des champignons phytopathogènes par les sidérophores	
5.3.4. Rhizobactine des <i>Rhizobium</i>	37
5.4. Induction de l'immunité des plantes	
5.4.1. Les éliciteurs de l'ISR	
5.4.2. Flagelline des <i>Rhizobium</i>	
<b>Matériel et méthodes</b>	
1. Matériel végétal	
2. L'isolement des souches à partir des nodules	
2.1. Préparation des nodules	
2.2. Broyage des nodosités et ensemencement du broyat	
3. Milieu d'isolement des <i>rhizobiums</i>	42
4. Screening des souches	
4.1. Caractères cultureux	
4.2. Caractères morphologiques	
4.2. Caractères morphologiques	
4.3. L'effet de la croissance des souches sur le pH du milieu	
4.4. Caractères biochimiques	
4.4.1. Test de la catalase	
4.4.2. Test de l'oxydase	43
4.4.3. Le métabolisme des glucides	
4.5. L'étude de la croissance des <i>Rhizobium</i> sous conditions de stress	
4.5.1. Le pH	
4.5.2. La température	
4.5.3. L'effet du NaCl	
4.6. Etude de la résistance des <i>Rhizobium</i> aux antibiotiques	
4.6.2. Les antibiotiques utilisés	
5. Test d'antagonisme ( <i>Rhizobium</i> -champignon)	44
5.1. Les Champignons	
5.2. Tests de compétition	45

5.2.1.	Test préliminaire	
5.2.2.	Test par strie	
5.2.3.	Test d'étalement le <i>Rhizobium</i>	
4.2.4.	Etalement de champignons	
6.	Test d'antagonisme (filtrat de <i>Rhizobium</i> -champignon)	
6.1.	Méthode des puits	
6.1.1.	Tests préliminaires	
6.1.1.1.	Test sans filtration de la suspension	46
6.1.1.2.	Test avec filtration de la suspension sur papier Watt man	
6.1.2.	Test avec filtration de la suspension sous vide (test proprement dit)	
6.2.	Estimation d'inhibition	
6.3.	Méthode de disques	
7.	Effet des composés phénoliques sur la croissance des <i>Rhizobium</i>	
7.1.	Préparation l'inoculum de <i>rhizobium</i> .	
7.1.1.	Première méthode	
7.1..2.	Deuxième méthode	47
7.2.	Test sur milieu liquide	
7.3.	Test par des disques imbibes par le composé phénolique	
7.4.	Traitement statistique.	
<b>Résultats et discussions</b>		
<b>1<sup>ère</sup> partie</b>		
1.	Infectivité et efficience	49
2.	Résultats de l'isolement de bactéries à partir des nodules	51
2.1.	Production de polysaccharides	
2.2.	L'influence des souches étudiées sur le pH du milieu	54
3.	Caractères biochimiques	
3.1.	Le métabolisme des glucides	
4.	Tolérance aux différents facteurs	55
4.1.	Le pH	
4.2.	La température	56
4.3.	Tolérance au NaCl	58
<b>2<sup>ième</sup> Partie</b>		
<b>L'antibiorésistance intrinsèque</b>		
1-	Distribution de l'antibiorésistance	60
2.	profil de l'antibiorésistance	
<b>3<sup>ième</sup> Partie</b>		
<b>Tests d'antagonisme</b>		
1.	bactéries –champignons	65
1.1.	Test préliminaire: ensemencement par touche	
1.1.1.	Test d'une souche de <i>Rhizobium</i> contre 04 champignons	67
1.1.2.	Une souche de <i>Rhizobium</i> contre une souche de champignon	
2.2.	Test d'antagonisme: ensemencement par strie	70
2.3	Test d'antagonisme: <i>Rhizobium</i> -- champignon par étalement	75
2.3.1.	Étalement de <i>Rhizobium</i>	
2.3.2.	Étalement de champignons	77

2.	filtrats des souches de <i>Rhizobium</i> - champignons	
2.1.	Tests préliminaires	
2.1.1	Test1: Centrifugation de la suspension sans filtration sur millipores	78
2.1.2.	Test2: filtration de la suspension sur papier Watt man	
2.2.	Test avec filtration de la suspension sous vide	
2..2.1	Méthodes de puits	
2.2.2.	Méthode de disques	79
<b>4</b>	<b>ème Partie</b>	
	Action des composés phénoliques sur la croissance de <i>Rhizobium</i> .	
1.	Etude en milieu solide	83
2.	Etude en milieu liquide	85
2. 1.	L'effet des composés phénoliques sur la croissance des <i>Rhizobium</i>	
2.1.1.	Effet des phénols simples	
2.1.1.1.	Effet de l'hydroquinone	
2.1.1.2.	Effet de résorcinol.	87
2.1.1.3.	Effet de phloroglucinol.	88
2.1.1.4.	Effet de pyrocatechol	90
2.1.2.	Effet de Flavanones	92
2.1.2.1.	Effet de la naringine	
2.3.	Effet des acides phénoliques	93
	Effet de l'acide p-coumarique	
3.	Traitement statistique	
	<b>Conclusion générale</b>	99
	<b>Références bibliographiques</b>	104
	<b>Annexes</b>	

## Liste des figures

No	page
<b>Fig. 1</b> Structure chimique de trois composés phénoliques.	12
<b>Fig. 2</b> Schéma structural d'un facteur Nod. (Chataigné, 2007)	17
<b>Fig. 3</b> Etapes de la formation d'un nodule dans une racine latéral (Chatagné, 2007)	19
<b>Fig. 4</b> bactéroïdes de <i>Rhizobium</i> dans un nodule www.rdg.ac.uk/AcaDepts/sb/rhizobium 6 Juillet 2006	19
<b>Fig. 5</b> léghémoglobine dans un nodule	20
<b>Fig. 6</b> flagelles du <i>Rhizobium leguminosarum</i> www.cnpab.embrapa.br/educacao/baby/rizobio.2002	21
<b>Fig. 7</b> colonies muqueuses de <i>Rhizobium sp.</i> www.cea-technologies.com/article.2008	23
<b>Fig. 8</b> schéma de la surface d'une paroi de <i>Rhizobium</i> . www.ncbi.nlm.nih.gov/.../1998	24
<b>Fig. 9</b> Arbre phylogénique des <i>Rhizobium</i> basé sur le séquençage du rARN 16s (refework, 2002)	26
<b>Fig. 10</b> Résistance systémique induite chez les plantes par des <i>Rhizobium</i> . Jordan et al., 2008)	38
<b>Fig. 11</b> Etapes de préparation des nodules	41
<b>Fig. 12</b> Broyage des nodules jusqu'à l'obtention d'un aspect laiteux	42
<b>Fig. 13</b> Nodosités sur les racines de la fève cultivées dans les régions de: a: Maghnia; b: Zenata et c: Souahlia	50
<b>Fig. 14</b> Production de polysaccharides par les <i>Rhizobium</i> : RZ6, RG4, RG4	52
<b>Fig. 15</b> Exemples de <i>Rhizobiums</i> (bâtonnets Gram négatif); observation "x100 " au microscope optique, Zeiss	53
<b>Fig. 16</b> Exemples De croissance de RZ <sub>4</sub> à pH 9 et 5 et de 05 autres souches à pH 9.	56
<b>Fig. 17</b> cinétique de la croissance aux différentes températures. RZ <sub>6</sub> , RM <sub>4</sub> , RS <sub>3</sub> et RG4	57
<b>Fig. 18</b> Cinétique de la croissance à différentes concentrations de NaCl.	59
<b>Fig. 19</b> Comparaison des nombres de résistances, d'intermédiaires et de sensibilités	62
<b>Fig. 20</b> Exemples de résistances et de sensibilités aux différents antibiotiques	64
<b>Fig. 21</b> Antagonisme entre <i>Rhizobium</i> et 4 genres de champignons	66
<b>Fig. 22</b> Résistance d'O <sub>2</sub> disposé en ensemencé par touche en 04 points de la surface du milieu YEM à l'encontre de <i>Rhizobium</i> (RM2)	66
<b>Fig. 23</b> Sensibilité espèces fongiques en présence de <i>Rhizobium</i> (diamètres	68
<b>Fig. 24</b> Effet suppressif de <i>Rhizobium</i> RZ1 sur le champignon R3	69
<b>Fig. 25</b> Diamètres d'inhibition des champignons par les souches de <i>Rhizobium</i>	70
<b>Fig. 26</b> Effet suppressif des <i>Rhizobium</i> RZ1 et RG2	72
<b>Fig. 27</b> Effets suppressifs de <i>Rhizobium</i> : RZ3 sur <i>A. niger</i> (BDB5, RM1 sur <i>Alternaria</i> (O11) et RZ6 sur <i>F. oxysporum</i> F16.	73
<b>Fig. 28</b> Inhibition d' <i>A. niger</i> par les souches RM3 et RZ4	74
<b>Fig. 29</b> Suppression totale <i>Trichoderma</i> par RZ6 et <i>F.oxysporum</i> par RZ6	76
<b>Fig. 30</b> Suppression totale de la croissance d' <i>Aspergillus flavus</i> . (O2) Etouffement d' <i>Alternaria sp.</i> O11 par une souche de <i>Rhizobium</i> ((J. +2)	76
<b>Fig. 31</b> Etouffement de <i>rhizobium</i> par la croissance mycélienne d' <i>Aspergillus niger</i>	77
<b>Fig. 32</b> Effet du filtrat de <i>Rhizobium</i> RZ <sub>1</sub> sur <i>Penicillium sp.</i> BT2	78
<b>Fig. 33</b> Effet des filtrats de : RZ <sub>1</sub> sur <i>Alternaria</i> . O11, RZ <sub>1</sub> sur <i>Penicillium sp.</i> BT2. RG <sub>1</sub> sur <i>Penicillium sp.</i> BT2	79
<b>Fig. 34</b> Effet de: RM <sub>1</sub> et RS <sub>1</sub> et RZ <sub>1</sub> sur <i>Penicillium spp.</i> : RZ3 sur, RF <sub>2</sub> , RM <sub>4</sub> et RM <sub>5</sub> sur <i>Fusarium</i> : RZ <sub>2</sub> sur <i>Alternaria</i>	81
<b>Fig. 35</b> croissance de : RZ6 en présences de phloroglycinol, Pyrocathécol, le résorcinol, l'hydroquinone et l'acide p-coumarique et de RM <sub>2</sub> et RS <sub>4</sub> en présence de la Nar	84
<b>Fig. 36</b> L'effet inhibiteur de l'hydroquinone sur les deux souches RM1 et RM2 (à gauche) et sur RZ6, (à droite) hydroquinone avec 03 autres composés	84

<b>Fig. 37</b>	Croissance de a: RM2 en présence de l'acide p-coumarique, b: RM <sub>1</sub> en présence de la Naringine et c: RS1 en présence de résorcinol	<b>85</b>
<b>Fig. 38</b>	Evolution de la croissance avec et sans hydroquinone (RZ6 et RZ2)	<b>86</b>
<b>Fig. 39</b>	Evolution de la croissance (avec et sans résorcinol) de RS <sub>1</sub> et RS <sub>3</sub>	<b>87</b>
<b>Fig. 40</b>	évolution de la croissance (avec et sans Phloroglucinol) de RZ <sub>5</sub> et de RM <sub>4</sub>	<b>89</b>
<b>Fig. 41</b>	Evolution de la croissance (avec et sans Pyrocatechol) de RZ <sub>2</sub> et RM <sub>6</sub>	<b>90</b>
<b>Fig. 42</b>	Evolution de la croissance (avec et sans naringine) de RM <sub>1</sub> et de RS2	<b>93</b>
<b>Fig. 43</b>	Evolution de la croissance d (avec et sans p-coumarique) de RZ5 et RM <sub>2</sub>	<b>93</b>

## **Liste des tableaux**

<b>No</b>	<b>titres</b>	<b>Page</b>
<b>Tab.1</b>	compositions moyennes des féveroles d'hiver et de printemps	<b>7</b>
<b>Tab.2</b>	Activités biologiques des composés phénoliques (Bahorun., 1997)	<b>9</b>
<b>Tab.3</b>	Quelque exemples d'intervention des composés phénoliques dans la relation entre la plante et son environnement (Macheix et al., 2005)	<b>10</b>
<b>Tab.4</b>	principales classes de composés phénoliques (Macheix et al., 2005)	<b>11</b>
<b>Tab.5</b>	les différentes espèces des deux genres <i>Rhizobium</i> et <i>Bradyrhizobium</i> .	<b>29</b>
<b>Tab.6</b>	Quelques exemples de bactéries et légumineuses associées	<b>32</b>
<b>Tab.7</b>	Les antibiotiques utilisés avec charges des disques.	
<b>Tab.8</b>	Les caractéristiques des racines et des nodules des plantes des 4 régions.	<b>51</b>
<b>Tab.9</b>	morphologies des colonies des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>51</b>
<b>Tab.10</b>	Résultats du pH final des 20 souches du milieu d'ensemencement	<b>55</b>
<b>Tab.11</b>	Résultats du métabolisme des glucides par les isolats de <i>rhizobium</i>	<b>55</b>
<b>Tab.12</b>	Distribution des souches selon les régions et le nombre des résistances	<b>60</b>
<b>Tab.13</b>	taux de résistance vis-à-vis des antibiotiques utilisés Comparaison aux valeurs critiques (Comité française de l'antibiogramme, 2000)	<b>61</b>
<b>Tab.14</b>	Effets des <i>Rhizobium</i> sur la croissance des champignons	<b>65</b>
<b>Tab.15</b>	Effets suppressifs des <i>Rhizobiums</i> sur la croissance des Champignons	<b>67</b>
<b>Tab.16</b>	Action des <i>Rhizobium</i> sur les différents genres de champignons	<b>71</b>
<b>Tab.17</b>	Effets des filtrats des <i>Rhizobium</i> sur les champignons.	<b>80</b>
<b>Tab.18</b>	l'effet des 3 phénols simples sur 20 souches de <i>Rhizobium</i> (méthode des disques)	<b>83</b>
<b>Tab.19</b>	Effet de l'hydroquinone sur la croissance des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>86</b>
<b>Tab.20</b>	Tab.20. Effet du Résorcinol sur la croissance des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>88</b>
<b>Tab.21</b>	Effet du phloroglucinol sur la croissance des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>89</b>
<b>Tab.22</b>	Effet du pyrocatechol sur la croissance des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>91</b>
<b>Tab.23</b>	Effet de la naringine sur la croissance des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>92</b>
<b>Tab.24</b>	Effet de l'acide p-coumarique sur la croissance des souches de <i>Rhizobium</i>	<b>94</b>

# *Introduction générale*

Les agronomes ont remarqué depuis longtemps, que les légumineuses améliorent les terres dans lesquelles on les cultive. Elles sont capables de se développer dans les milieux démunis d'azote combiné (**Leysen et Goffart, 1977**). Importante pour les agriculteurs, puisqu'elle ne nécessite pas d'engrais pour sa croissance (**Duke, 1981**). La féverole *Vicia faba* est parmi les légumineuses les plus facile à cultiver, elle est riche en protéines (22 à 30%) et certains autres composés (**Morsy et Tarrad., 2005**), et est utilisée pour l'alimentation animale et la consommation humaine, mais les facteurs antinutritionnels qu'elle contient dans ses graines limitent sa consommation.

La fixation symbiotique de l'azote est la principale voie d'entrée de l'azote dans l'écosystème: sol-plante (**Newton et Burgess, 1983**), elle est catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase (**Dixon et Wheeler, 1986**), cette fixation est due aux bactéries symbiotiques appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* qui sont responsables de la plus grande partie de la fixation de l'azote (**Ndoye, 1990**), cette voie représente plus de la moitié de la fixation de l'azote, estimée moyennement à  $20.10^6$  tonnes par an (**Kaminski, 1991**).

Dans le cas de la symbiose *Rhizobium*- légumineuses, les *Rhizobium* induisent sur les racines, et parfois sur les tiges, la formation du nodule, à l'intérieur duquel ces bactéries se transforment en bactéroïdes: forme capable de convertir l'azote atmosphérique en ammonium, ce dernier est utilisé par la plante hôte. En retour la plante hôte procure à la bactérie des composés carbonés nécessaires à sa croissance et à la fixation d'azote.

Pour **Redmont et al. (1986)** la symbiose *Rhizobium*- légumineuses est gouvernée par un échange de signaux moléculaires très spécifiques entre les deux partenaires. Les plantes initient le dialogue en libérant dans le sol diverses molécules organiques. Parmi elles les flavonoïdes, qui sont des composés importants de la racine et qui vont activer directement la protéine *Nod D* régulatrice de la transcription des gènes *nodABC*.

**Phillips (1992)** constate que les flavonoïdes produits par les différentes légumineuses ne sont pas les mêmes, par exemple les flavonoïdes produits par *Medicago sativa* sont différents de celles produits par *Trifolium* ou *Sesbania*

Les gènes communs *nodABC* sont présents chez tous les *Rhizobium*, sont responsables de la formation du squelette des facteurs *Nod* et contrôlent aussi les premières phases de l'infection et de la nodulation (**Dénarié et al., 1996**).

Selon **Singleton (2005)** la fixation symbiotique de l'azote demande beaucoup d'énergie de 12 à 16 molécules d'ATP environ, pour chaque molécule d'azote fixée.

La symbiose *Rhizobium*- légumineuses est le résultat d'un équilibre entre les différents facteurs de l'environnement affectant la plante et la bactérie. Donc la réussite de l'infection des légumineuses et la nodulation dépend des facteurs de l'environnement et de la survie des *Rhizobium*, pour cela la tolérance des *Rhizobium* aux différents stress d'environnement (le pH, la température et le stress salin) est une propriété recherchée pour les utiliser dans des sols appauvris en azote.

Notre thème d'étude s'intéresse à la recherche de telles souches pour comparer leurs aptitudes aux différentes conditions de stress (pH ; température ; concentrations de NaCl et réaction à certains antibiotiques).

L'azote est l'un des principaux facteurs limitant la croissance des végétaux qui ne peuvent l'assimiler que sous sa forme combinée par l'intermédiaire des bactéries fixatrices de l'azote, en effet la symbiose *Rhizobium*- légumineuses est l'une des relations d'échanges biologiques les plus étudiées à plusieurs niveaux : physiologiques ; microbiologiques ; biochimiques ; et régulations génétiques ; ceci grâce au rôle très bénéfiques que jouent ces *Rhizobium* dans la nodulation des leurs partenaires végétales, cette nodulation se traduit par la fixation de l'azote atmosphérique par des mécanismes très complexes.

Alors que l'étude taxonomique ou de classification des *Rhizobium* a connu de nombreux bouleversements et plusieurs révisions : phénomène qui revient en grande partie à la diversité de ces bactéries, toutefois la caractérisation microbiologique (phénotypique) garde toujours son importance

De même l'étude des gènes responsables de ce dialogue moléculaire s'avère intéressante puisque la production des composés phénoliques en est intimement liée (**Pankhurst and Biggs, 1980**). L'étude des mutants permet des progrès notoires dans la connaissance des gènes bactériens impliqués dans le processus de nodulation et de la fixation symbiotique ; leur régulation et plus récemment les produits de certains d'entre eux (**Long, 1990**).

Dans le souci de voir l'action de ces composés (molécules très intéressantes (en biologie moléculaire, médecine, pharmacognosie et microbiologie) sur des souches de *Rhizobiums*, nous avons tenté de voir l'évolution de la croissance des *Rhizobiums* en contact de ces composés phénoliques (synthétiques) et de voir s'ils ont un effet d'activation ou d'inhibition.

L'étude des conditions de la croissance des ces bactéries et de leurs nutrition permet de comprendre leurs métabolismes carboné et azoté. La féverole fixe mieux son propre azote que toute autre légumineuse .par conséquent l'utilisation d'engrais azoté n'est pas recommandée. *Vicia faba* est une culture importante en Europe et en Afrique du Nord, en Moyen Orient en Chine, au Canada et en Australie. Dans certains pays comme le Canada par exemple l'utilisation des fèves pour la consommation animale et humaine et pour les semis correspond à près de 60% de la production. Au niveau mondial elle augmente de 3-5% annuellement (**Skrypetz, 2005**).

La capacité d'un inoculant *Rhizobium* de coloniser le sol dans la quantité suffisante pour fournir la nodulation efficace dépend fortement du type de sol, c'est pour cela que l'étude des facteurs inhérents de sol tels que le pH ; la température et le stress salin trouve sa justification. (**Slattery et al.2003**).

L'économie en fumures azotées qui peut être réalisée grâce à la culture de légumineuses est un enjeu économique et agronomique réel.

Il est clair que L'inoculation des cultures des légumineuses qui consiste à apporter pendant le semis la bactérie spécifique de la plante cultivée est nécessaire :

- lorsque la population indigène possède un faible potentiel de fixation.
- lorsque le microsymbionte est totalement absent ou insuffisant dans le sol pour établir une nodulation.

**Brockwel et al. (1982)** proposent deux critères pour sélectionner les souches de *rhizobium*:

- leur capacité à former des nodosités efficaces
- leurs compétitivités par rapport aux autres souches pour la formation des nodosités.

Les fonctions biochimiques de certains gènes nod a pu être déterminé (**Roch et al., 1991**) on a pu caractériser le produit des gènes nod qui même en absence de la bactérie il est capable de provoquer la formation de vraies nodosités sur le système racinaire de la plante (**Truchet et al., 1991**), ainsi les techniques de la biologie moléculaire présentent un outil d'intervention remarquable pour obtenir des souches à pouvoir de fixation amélioré.

Tous ces facteurs rassemblés incitent à la définition des conditions de culture des souches étudiées pour enfin établir leurs aspects nutritionnels et physiologiques et par la suite la caractérisation des inducteurs des gènes nod pour mieux représenter les parties du dialogue moléculaire entre la féverole et les souches nodulantes. La féverole (*Vicia faba*.) est l'une des plus importantes cultures de légumineuses en Algérie. Il est cultivé essentiellement pour répondre à l'alimentation humaine et animale.

Les champignons sont parmi les facteurs les plus importants des maladies affectant les plantes, en limitant le rendement des cultures de légumineuses dans de nombreux pays.

Selon **Abou-Zeid et al., (1997)** et **Infantin et al., (2006)**, putréfaction racinaire, causée par *Aphanomyces euteiches*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.* *Sclerotium rolfsii* sont les plus destructrices du sol et causent des maladies de pois, pois chiches, les lentilles, féverole et lupin. En ce qui concerne l'environnement et la santé au sujet de l'utilisation des produits chimiques, il existe un grand intérêt à trouver d'autres approches de contrôle pour l'utilisation dans les stratégies de lutte biologique pour les maladies des cultures.

De plus en plus, la protection de l'environnement s'impose comme une préoccupation mondiale majeure. Dans le domaine de l'agriculture, l'expansion et la productivité agricole doivent passer par une gestion optimale des champignons phytopathogènes et des mauvaises herbes en minimisant les impacts négatifs sur le milieu biophysique.

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes offre un potentiel très prometteur et viable de par la diversité des agents microbiologiques (bactéries, virus, champignons protozoaires, nématodes. (**Laird et al., 1990; Kouassi., 2000**). Selon **Van Lenteren (2003)**, La lutte biologique augmentative, qui consiste à lâcher périodiquement de grandes quantités d'ennemis naturels, est appliquée commercialement à plusieurs systèmes de culture sur de vastes zones.

La mise en profil de l'effet bénéfique de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* sur les légumineuses en termes de fixation biologique de l'azote a été l'une des priorités au cours des dernières années. (**Deshwal, et al., 2003**).

## Introduction générale

De nombreuses espèces de *Rhizobiums* peuvent promouvoir la croissance des plantes et aussi inhibent certains champignons pathogènes. Elles sont signalées à inhiber de manière significative la croissance de champignons pathogènes, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia spp*, *Fusarium sp.* et *Pythium spp* à la fois dans les légumineuses et les non légumineuses. (Estevez et al., 2002), (Bardin et al., 2004). Dans plusieurs cas, le potentiel de lutte biologique direct a été démontré, en particulier pour les maladies des plantes causées par *Phytophthora*, *Rhizoctonia* et *Fusarium* et les agents pathogènes. (Dalpé, et Monreal, 2004).

En milieu naturel, la plupart des cas de la lutte biologique se produisent à partir d'un mélange d'antagonistes. La plupart des méthodes de lutte biologique contre des maladies des plantes utilisent comme agent de lutte biologique un seul antagoniste contre un seul pathogène. (Raupach, et Kloepper, 1998)

*Rhizobium* est la plus connue des bactéries qui agit comme un agent très important de lutte biologique contre les phytopathogènes. (Chenn., 1999). La production de Rhizobitoxine agit comme facteur suppressif (antibiose) de différentes maladies des plantes, en inhibant l'agent pathogène (Deshwal., 2003 ; El-Mehalawy., 2004). D'autre part, ces bactéries ont un effet antagoniste sur la microflore néfaste des végétaux par la production des substances antimicrobiennes. Chez les légumineuses, la présence de ces substance dans le sol joue un rôle important dans l'élimination de différents types de champignons qui attaquent ses racines et provoquent des maladies graves.

L'inoculation des souches enrobées dans le sol est une opération onéreuse. De plus, les souches posent un problème de persistance et de compétition dans le sol (conditions de croissance, conditions édaphiques, ...etc.), d'où la nécessité de chercher une alternative plus efficace

Le filtrat de culture de *Rhizobium* protège également les plantes à un niveau élevé, ce filtrat de culture de *Rhizobium* renferme des signaux capables d'induire la résistance des plantes au pathogène. Ces signaux seraient réprimés dès que *Rhizobium* entre en contact avec les plantes (Essalmani et Lahlou. 2003).

Il nous semble que préparer des filtrats contenant les substances antifongiques et les introduire dans le sol (arrosage) pourrait surmonter le problème d'une faible persistance des *Rhizobium* dans le sol. Pour se faire il est fort intéressant de voir l'action des filtrats des souches de *Rhizobium* sur la croissance de certains champignons phytopathogènes

*Synthèse  
bibliographique*

### 1. Les légumineuses

Les légumineuses grainières représentent la famille ayant la plus grande importance économique, Elles sont distribuées dans le monde entier, principalement dans les régions chaudes. Elles constituent une part très importante de l'alimentation de nombreuses populations, notamment en Asie, en Afrique et en Amérique Centrale et Latine (Reddy et al., 1985).

la plus connue des particularités biologiques des légumineuses est leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol de la famille des Rhizobiacées, pour former des organes symbiotiques racinaires « nodules » au sein desquels ces bactéries fixent l'azote atmosphérique (Mylona et al., 1995). Par cette capacité de fixation l'azote, les légumineuses peuvent améliorer:

-Les propriétés physiques et biologiques des sols (Hoshikawa, 1990) grâce à leurs résidus qui sont riches en azote (La Rue et Patterson, 1981).

-Le bilan de l'azote dans les systèmes de cultures (Wani et al., 1995 ; Peoples et al., 1995 ; Chalck, 1998). Les légumineuses ont aussi la capacité à solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore occlus par leurs exsudats racinaires (Nagarajah et al., 1970; Gardener et al., 1981 ; Arihara et Ohwaki, 1989 ; Subbarao et al., 1997).

De plus l'introduction de légumineuses dans des rotations diminue les pertes d'azote par lessivage et la pollution des nappes par des nitrates.

#### 1.1. Taxonomie des légumineuses

Les légumineuses sont divisées en trois familles : Papilionacées, Césalpiniacées et Mimosacées ; généralement identifiables par leurs fleurs. Les Papilionacées (Fabacées) représentent la famille la plus importante des légumineuses, puisqu'elle comprend 12 000 espèces et 500 genres. Elle est caractérisée par sa fleur en forme papilionacée. Parmi les espèces les plus importantes : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la lentille (*Lens culinaris*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève et féverole (*Vicia faba*). (Annexe1)

#### 1.2. La féverole *Vicia faba* L.

La féverole *Vicia faba* appartient à l'ordre des léguminales et à la famille des Papilionacées, elle est la légumineuse la plus facile à cultiver comme engrais vert. Elle est, tout comme la fève, consommée tout particulièrement dans les pays circumméditerranéens ; en Italie par exemple elle est cultivée principalement pour la consommation humaine (Nozzolillo et al., 1989).

Le genre *Vicia faba* regroupe environ 120 espèces réparties dans l'hémisphère Nord tempéré et l'Amérique du Sud. Sa culture a commencé entre l'Afghanistan et l'Est de la Méditerranée. Elle s'est ensuite développée en direction de l'Afrique du Nord, de l'Asie Centrale, de l'Europe Centrale et Occidentale (Duc, 1997).

Il existe plusieurs sous espèces et variétés de *Vicia faba*. On reconnaît essentiellement trois groupes définis par la taille des graines, qui peuvent être petites (variété minor), moyennes (variété équina) ou grosses (variété major). Le terme major désigne les graines que l'on appelle communément « fèves » dont la longueur est supérieure à deux cm, alors que minor correspond au terme « féverole », ce sont des graines de 0.5 à 1,5cm de long (Atik, 1999).

*Vicia faba* est une plante annuelle, à tige rugueuse et dressée, non ramifiée, de 20 à 60 cm de hauteur, elle produit une ou plusieurs tiges creuses à partir de la base (annexe1)

. Les feuilles alternées et pennées sont constituées d'une à trois paires de folioles très grandes mesurant chacune jusqu'à 8 cm sans vrilles. Les fleurs sont généralement blanches avec des ailes noires, par deux à cinq petites grappes pédonculées. Les gousses sont longues de 8 à 20 cm (**Heywood et Richardson, 1964 ; Guinochet et De Vilmorin, 1984**).

Au sein de la variété minor, il existe une grande diversité de coloration de fleurs (**Picard, 1976 ; Crofts et al., 1980 ; Cabrera et Martin, 1986**) et de graines :

- Les fleurs totalement blanches : Elles donnent naissance à des graines dépourvues de tannins et d'anthocyanes. Ces graines sont en général de couleur grise mais elles peuvent être colorées en vert ou même en noir par des pigments non anthocyaniques.
- Les fleurs présentant une macule colorée sur les pétales ailés, et une pigmentation normale sur l'étendard.
- Les fleurs uniformément pigmentées.

### **1.3. Qualité nutritionnelle et composition de la graine de fève**

Selon (**Brun, 1991**) en France, il existe deux catégories de variétés de fève, celles du printemps semées en fin de Février début de Mars et récoltées en fin d'Août, leurs besoins hydriques sont élevés en Juin et Juillet ce qui limite leurs aires de cultures aux zones maritimes bien arrosées et à la partie Nord-est de France (voir **annexe 1**), celles d'hiver. Semées fin d'Octobre à mi-novembre et récoltées à la mi-août et présentent une certaine sensibilité au froid et aux maladies. Leurs compositions moyennes en matières azotées totales (M.A.T), acides aminés essentiels, amidon, cellulose et minérales sont représentées dans le **Tab.1**, La fève du printemps présente une teneur en protéines supérieur à celle de la fève d'hiver.

**Tab. 1.** compositions moyennes des fèves d'hiver et de printemps

composition moyenne (g /kg MS)	(Brun, 1991)			Métayer et al., (2003)	
	Fève de printemps	Fève d'hiver	Gloria	Devine	EE0T0V
Mat. Azot. totales	<b>310</b>	<b>300</b>	<b>337.8</b>	<b>330.5</b>	<b>298.5</b>
Lysine	<b>2.2</b>	<b>19.2</b>			
méthionine	<b>4.1</b>	<b>2.1</b>			
Cystine	<b>11.0</b>	<b>4.0</b>			
Thréonine	<b>2.6</b>	<b>10.6</b>			
tryptophane	-	<b>2.5</b>			
Amidon	<b>440</b>	<b>440</b>	<b>408</b>	<b>391.0</b>	<b>443.2</b>
Cellulose	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>86.8</b>	<b>87.6</b>	<b>82.5</b>
Minéraux :					
Phosphate	<b>40</b>	<b>40</b>			
Calcium	<b>5.7</b>	<b>5.7</b>			
	<b>13</b>	<b>13</b>			

D'autre part, la graine contient des facteurs antinutritionnels (F.A.N) limitant son utilisation

### 1.4. La composition phénolique de la graine de la fève

Les graines de la fève sont riches en molécules phénoliques, principalement en tannins et en flavonoïdes (**Brun et Chevalier, 1987**).

Ces composés ont une relation avec certains caractères morphologiques de la fève telle que la couleur des fleurs. La teneur en tannins chez les variétés pigmentées est plus élevée que chez les variétés blanches, elle est estimée de 0.8 à 24g/kg de matière sèche de graine (**Kaysi et Melcion, 1992**).

### 1.5. Intérêt des composés phénoliques sur la santé humaine

Les composés phénoliques sont d'importance capitale dans la production végétale, répandus dans la nature, alors que l'homme en consomme jusqu'à 10g par jour, ils sont pour la plupart solubles dans l'eau, et ont un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 daltons et peuvent se complexer avec des protéines (**Haslam, 1995**), ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux benzéniques portant un ou plusieurs groupement hydroxyles, cette structure de base peut devenir complexe pour inclure des dérivés de type ester ou glucoside (**Valentao et al., 2007**).

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante. En effet, leurs propriétés bénéfiques (**tab. 2**) pour la santé humaine seraient nombreuses : effet antimicrobien et intervention sur l'activité de nombreuses enzymes, effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux (**Chung et al., 1998**). Ils peuvent également participer à la bonne conservation de certains aliments transformés, comme l'huile d'olive, en limitant l'oxydation des lipides qu'ils contiennent (**Servili et al., 2004**).

Les composés phénoliques peuvent agir sur de nombreux processus impliqués dans le développement des maladies cardio-vasculaires, par exemple en inhibant l'oxydation des LDL à l'origine de l'athérosclérose (**Léger et al., 2000**). *In vitro*, parmi les flavonoïdes étudiés, les flavonols et les flavan-3-ols sont les plus efficaces (**Da Silva et al., 1998**), tandis que leurs dérivés glycosylés, ou les flavones et la génistéine, ont une activité plus faible.

Les polyphénols peuvent ainsi réduire ou bloquer de nombreux mécanismes impliqués dans la genèse ou l'amplification de pathologies cardio-vasculaires ou cancéreuses, mais l'effet des composés phénoliques ne se limite pas à ces deux pathologies. En effet, ces composés pourraient également induire des effets vasodilatateurs (**Kinsella et al., 1993**), exercer un effet antimicrobien et une action antivirale par inhibition de la transcriptase reverse, stimuler le système immunitaire (**Formica et Regelson, 1995**), jouer un rôle protecteur dans plusieurs maladies neuro-dégénératives (**Sun et al., 2002**), et réduire le développement d'ulcères par liaison avec certaines protéines de l'épithélium gastrique (**Saito et al., 1998**).

L'intérêt cosmétique des polyphénols est multiple et directement corrélé aux leurs propriétés: propriétés antioxydants, capacité à chélater les métaux, ils participent à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que protecteurs de la dégradation des protéines de structure de la peau, le seul frein à l'utilisation des polyphénols en

cosmétologie est leur instabilité dans les formulations cosmétiques conduisant à des variations possibles de la couleur et de l'odeur des produits (**Gloss., 2002**).

**Tab. 2.** Activités biologiques des composés phénoliques (**Bahorun., 1997**),

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes	Didry <i>et al.</i> ,1982 Ravn <i>et al.</i> ,1984 Hayase et kato.,1984
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses	Mabry et Ulbelen.,1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes	Stavric et matula.,1992 Das <i>et al.</i> ,1987 Bidet <i>et al.</i> ,1987 Bruneton.,1993 Aruoma <i>et al.</i> ,1995
Anthocyanes	Protectrices capillaro- veineux Effet stabilisants sur le collagène Antioxydantes	Bruneton .,1993 Masquelier <i>et al.</i> ,1979 Bahorun <i>et al.</i> ,1994,1996
Proanthocyanidines	Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoire	De oliveira <i>et al.</i> ,1972 Brownlee <i>et al.</i> ,1992 Kreofsky <i>et al.</i> ,1992
Tannins galliques et cachectiques	Antioxydants	Okuda <i>et al.</i> ,1983 Okamura <i>et al.</i> ,1993

### 1.6. Intérêt physiologique des composés phénoliques

Les composés phénoliques, tels que les flavonoïdes sont responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux, l'astringence et l'amertume des aliments et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols, leurs localisations peuvent être dans les différentes parties d'une plante (**Lugasi et al., 2003**) (**voir annexe 1**).

Pour **Sun et al. (2002)** Les cellules végétales répondent aux stimulations environnementales, en synthétisant des métabolites secondaires, tels que les polyphénols, qui peuvent les protéger contre les agresseurs, ainsi la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes (**Tab.3**) est souvent corrélée à la teneur en composés phénoliques. ils ont également été décrits dans plusieurs processus physiologiques :

Croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, en outre les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (**Macheix et al., 2005**).

**Tab. 3.** Quelques exemples d'intervention des composés phénoliques dans la relation entre la plante et son environnement (**Macheix et al., 2005**)

Actions biologiques	Principaux composés impliqués
Intervention dans les symbioses <i>Rhizobium</i> / légumineuses	
Activation des gènes de nodulation de <i>Rhizobium meliloti</i> de <i>Rhizobium japonicum</i>	Lutéoline Daidzeine, génisteine
Inhibition de l'activation des gènes de nodulation de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	
Intervention dans les relations hôte/parasite	Kaempférol, daidzeine, génisteine
Activation des gènes de virulence d' <i>Agrobacterium</i>	Acétosyringique
Barrière physique ou chimique, constitutive ou induite	
Synthèse des phytoalexines	Lignines, acide chlorogénique, tannins
Chez les angiospermes parasites	
Protection contre le rayonnement UV	Isoflavonoïdes, furocoumarine
Intervention dans les relations plante/animaux	Iso flavonoïdes
Couleur et pollinisation	Flavonoïdes, esters hydroxycinnamiques
Protection contre des herbivores	Flavonols, anthocyanes Tannins

### 1.7. Effets des composés phénoliques sur le *Rhizobium*

Le catéchol, l'acide p-coumarique, l'acide gentisique, l'acide salicylique, l'acide vanilliques ont aussi été reconnus comme inhibiteurs des *Rhizobium*. (**Ranga et al., 1973**). Certains composés phénoliques peuvent être inducteurs chez les espèces de *Rhizobium* et inhibiteurs chez d'autre, comme c'est le cas pour certain isoflavones, caractéristiques des légumineuses, la génisteine ou la daidzeine. (**Peters et al., 1986**)

Les tannins inhibent la croissance des *Rhizobium* (**Pankhurt et Jones., 1979**) sont révélés comme des inhibiteurs de la nodulation chez les haricots et d'autre légumineuses. (**Muthukumar et al., 1985**), une élévation de tannins dans les racines de *Phaseolus vulgaris* à provoqué la réduction du nombre de nodules, ces tannins sont toxiques pour les *Rhizobium* (**Wolff et al., 1993**).

La sécrétion des isoflavones par les racines de soja, attirent une bactérie symbiotique *Bradyrhizobium japonicum* (**Morris et al., 1998**), La concentration en isoflavones des extraits racinaires peut donc être un indicateur potentiel de nodulation et de fixation de N<sub>2</sub> d'une variété et donc indirectement de son métabolisme azoté au sens large. L'effet des isoflavones sur la mise en place de l'activité symbiotique peut présenter plusieurs intérêts d'ordre agronomique : augmentation du taux de l'azote dans la

plante, du taux de protéines dans les graines et du rendement (Ali, 1999). La coumarine et ses dérivés dont plus de 300 structures sont connues, ils participent dans les racines des plantes symbiotiques hébergeant *Rhizobium*, à la formation des nodules (Berenbaum, 1991).

### 1.8. Classification des composés phénoliques

ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tab.4) qui se différencient par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées), par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxydation, de méthylation,...) et par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autre molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques ...).

Tab. 4. principales classes de composés phénoliques (Macheix et al., 2005)

Squelette carboné	Classes	Exemple	Origine
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol, hydroquinone	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ac. hydroxybenzoïque	p-hydroxybenzobenzoiques	cerises, fraises
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ac. hydroxy cinnamique Coumarines	Ac. caféïques, fêruliques, acide p-coumarique Scopolétines, esculétine,	Citrus Tomates
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes -Flavonols -Anthocyanes -Flavanols -Flavanones -Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pelargonidine Catéchine, epicatéchine Naringénine, naringine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C <sub>15</sub> ) <sub>n</sub>	Tannins		Raisin rouge, kaki

#### 1.8.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone (Psotova et al., 2003).

##### • Les acides benzoïques

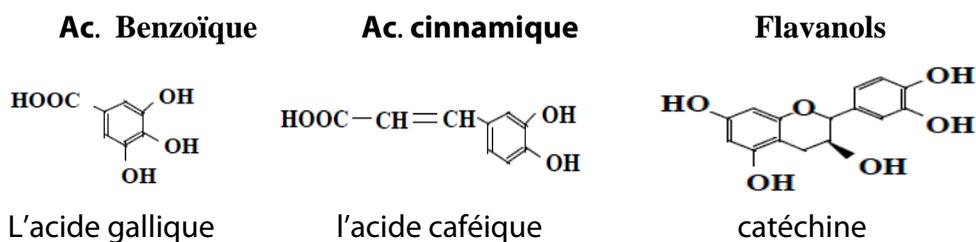
Pour Ribereau., (1968). Les acides benzoïques sont représentés par les acides (*p*-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques (Fig.01), syringiques, salicyliques, gentisiques...) et ils ont une formule de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>.

Alors que Les acides cinnamiques représentent une classe importante dont la structure est de type (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféïque (Fig. 02), l'acide fêrulique, et son dérivé 5-hydroxylé, et enfin l'acide sinapique. (Scalbert et Williamson., 2000).

### 1.8.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites poly phénoliques végétaux excrétés au niveau des pointes racinaires ils interviennent dans les processus de pigmentation des fleurs ; dans la protection des plantes contre les radiations UV et dans leurs mécanismes de défense contre les herbivores et les attaques microbiennes, ils présentent un intérêt médical vu leur activité anti-athérosclérose; anti-inflammation; anti-thrombose ; anti-ostéoporose; anti-tumorale. il y a des flavonoïdes glycolysés (l'héspéridine, la neohéspéridine et la naringine) et des flavonoïdes non glycolysés (la catéchine qui est une structure chimique donner dans la **Fig. 1** et la lutéoline) qui se différencient par leur solubilité en milieu aqueux. En fait, la solubilité des ces flavonoïdes est un facteur déterminant dans leurs applications thérapeutiques. (**Laura Radu., 2005**).

Pour **Brincic et Winans., (2005)**, ils constituent les premiers signaux échangés entre la plante et la bactérie, ils interagissent avec les *Rhizobium* par l'intermédiaire des protéines bactériennes Nod D, qui change de conformation, qui peut ainsi se lier aux promoteurs des gènes Nod et activer leur transcription.



**Fig.1.** Structure chimique de 03 composés phénoliques

### 1.8.3. Les tannins

Ils tannent (la rendre dure et imputrescible en se fixant sur les protéines) (**Biaye., 2002**), d'origine végétale, de structure variées, précipitent les alcaloïdes, la gélatine, et les protéines, souvent polymérisés, ils donnent des molécules de poids moléculaires allant de 500 à 3000 (PM). On trouve deux groupes: Les tannins hydrolysables (tannoïdes), ils appartiennent à la famille des hétérosides, se sont des polyesters d'oses (surtout représentés par le glucose) et d'acides phénols. On a:

1-Tannins gallique: esters d'oses (glucose) et d'acides galliques ou digalliques.

2-Tannins éllagiques: esters d'oses et d'acides éllagiques

Les tannins non hydrolysables dérivent de catéchol et des proanthocyanidol par condensation moléculaire, parfois classés parmi les flavonoïdes, ne renferment pas de sucre, dérivent des flavanes (insoluble dans la plupart des solvants. (**Atefeibu 2002**).

### 1.8.4. Les lignines

Nom générique donné à un complexe de polymères aromatiques de poids moléculaire élevé (10 000 - 20 000 daltons, dépendant de son degré de polymérisation. (**swit et al., 1979**), composant majeur des tissus des plantes vasculaires, elles représentent entre 18 à 35% de leurs poids total (**Kirk et fenn (1982), 1982**), en concentration elles son plus élevées chez les gymnospermes, (**haider, 1992**), composées de 03 alcools cinnamiques: alcools coumarinique,

coniférylique et sinapique. Leur dissolution est difficile. (Stevanovic-Janesic et Lemieux, 2007).

### 1.9. La composition phénolique de la graine de la fève

Les graines de la fève sont riches en molécules phénoliques, principalement en tannins et en flavonoïdes (Brun et Chevalier, 1987).

Ces composés ont une relation avec certains caractères morphologiques de la fève telle que la couleur des fleurs. La teneur en tannins chez les variétés pigmentées est plus élevée que chez les variétés blanches, elle est estimée de 0.8 à 24g/kg de matière sèche de graine (Kaysi et Melcion, 1992).

#### 1.9.1. Les flavonoïdes chez *Vicia faba*

Selon (Gábor et al., 1988) les flavonoïdes sont des composés naturels de types aromatiques appartenant à la famille des poly phénols, capables d'activer les gènes de nodulations. Ils donnent une coloration à la plante au-delà de la chlorophylle, les caroténoïdes et les bêtaïnes.

Phillips (1992) constate que les flavonoïdes ne sont pas tous les mêmes chez toutes les plantes supérieures. Ils ont une structure de base relativement simple et ils sont composés de deux cycles aromatiques de type phényle liés par une chaîne de trois carbones généralement cyclique.

Le degré d'oxydation de la chaîne carbonée donne les différentes classes des flavonoïdes : flavane, flavone, pro anthocyanidine, anthocyanine, flavonol et isoflavonoïdes, sont les classes principales. Chalcone, flavanone, aurone, dihydroflavonol, dihydrochalcone sont les classes minoritaires. Par ailleurs, les différents cycles peuvent être modifiés par hydroxylation, méthylation, acylation ou glycolysation. La grande variété de structures possibles est à l'origine de leur diversité dans la nature (Van der Meer et al., 1993).

Les flavonoïdes sont indispensables à l'établissement de la symbiose *Rhizobium* - légumineuses. Ils sont présents dans les racines et pour un certain nombre d'entre eux dans les exsudats racinaires. Ces flavonoïdes vont activer les protéines régulatrices de la transcription des gènes nod (Nod D) en se fixant sur la bactérie (Dénarié et al., 1992 ; Göttfert, 1993).

Nozzolillo et al. (1989) ont étudié l'ensemble de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, aboutissant ainsi à une proposition de contrôle génétique de la synthèse des phénols chez *Vicia faba*, dans laquelle l'ensemble des génotypes peut être repéré par rapport à quatre principales classes de flavonoïdes :

- Les flavones dont le principal aglycone est l'apigénine, sont présentes dans les téguments violets, beiges, verts et rouges et à un degré moindre dans les téguments noirs.
- Les flavonols dont le principal aglycone est la myricétine, se trouvent surtout dans les téguments verts et rouges, accessoirement dans les téguments bruns.
- Les anthocyanines sont présentes dans les téguments violets avec prédominance de quatre aglycones : delphinidine, cyanidine, malvinidine et pétunidine.

**Tomas-Lorent et al. (1990)** ont identifié dans les exsudats de graines de *Vicia faba* les composés suivants: 7,3', 4'-trihydroxy-flavone ; 7, 4' -dihydroxy-flavone, quercétine, Kaempférol, quercétine 7-glycoside et Kaempférol 7-glycoside

### 1.9.2. Les tannins chez *Vicia faba*

Révéls par (RMN-H1, CD), des composés monomères :(-)-épicatéchine et épigallocatechine, des procyanidines dimères : épicatéchine-(4 $\beta$ ,8)-catéchine, catéchine-(4 $\alpha$ 8)-catéchine, catéchine-(4 $\alpha$ , 8)-épicatéchine, et des prodelphinidine : gallocatechine-(4 $\alpha$ , 8)-catéchine, gallocatechine-(4 $\alpha$ ,8)-épicatéchine, gallocatechine-(4 $\alpha$ , 8)-épigallocatechine. Sont retrouvés dans les téguments de *Vicia faba* (**Kolodiej et al. , 1993; Martin-Tanguy et al. 1977**). Les effets négatifs des tannins condensés sur la valeur nutritive de la féverole ont contraint les producteurs à sélectionner des variétés sans tannins. (**Annexe 1**)

La production de la féverole sans tannins engendre non seulement une baisse de la productivité mais également une mauvaise résistance aux conditions de l'environnement (**Bond et al., 1986**).

Les tannins jouent un rôle de défense pour le végétal vis-à-vis des micro-organismes et des prédateurs (**Salunke et al., 1990**). Les génotypes sans tannins sont plus sensibles aux maladies (**Helsper et al., 1994**).

Ainsi:

- Des facteurs antitrypsines (protéines d'un poids moléculaire de 8000 à 10000 inhibant l'activité de la trypsine).
- De la vicine (2,6diamino-4,5dihydropyrimidine, 5-( $\beta$ -D glucopyranoside)) et de convicine (2,4,5-trihydroxy-6-Aminopyrimidine,5-( $\beta$ -D glucopyranoside, accumulées dans les cotylédons, responsables de dérèglement métabolique et de la baisse du poids des œufs chez la poule, ou du favisme chez l'homme).
- Des tannins condensés ou pro anthocyanidines localisés dans les téguments des graines colorées se complexent aux protéines et diminuant leur digestibilité (**Duc et al., 1995**).
- Des lectines, en se fixant sur la muqueuse intestinale, perturbent ainsi sa perméabilité, ils provoquent l'augmentation des pertes endogènes

## 2. La fixation d'azote

### 2.1. La fixation symbiotique de l'azote

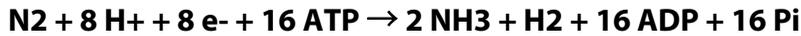
Il a fallu plus de cinquante ans, entre les travaux du français Jean-Baptist Boussingault et ceux des allemands **Hellriegel** et **Wilfarth**, pour établir, en **1888**, que l'aptitude des légumineuses à utiliser l'azote de l'air était due à la présence de nodules, sur les racines, induits par des bactéries contenues dans le sol. Cette découverte fut rapidement suivie par l'isolement des *Rhizobium* par Beijerinck, puis de plusieurs autres bactéries fixatrices d'azote, non associées aux plantes, comme *Azotobacter* et *Clostridium pasteurianum* (**Zryd et Diogon, 2003**).

**Peoples et al., (1995)**, constate que La fixation de l'azote par la féverole peut atteindre 100Kg/ha. Le potentiel de cette fixation par d'autres légumineuses comme niébé (*Vigna unguiculata*), l'arachide (*Arachis hypogaea*) et le soja (*Glycine max*) est respectivement de 32 à 89 %, 22 à 92 % et 0 à 95 % de leurs besoins en azote dans l'atmosphère.

La fixation de l'azote sur terre est le second plus important processus biochimique après la photosynthèse. Alors que l'utilisation des légumineuses en sols agricoles seulement, fixait 12 millions de tonnes d'azote, les Etats-Unis utilisaient 10 millions de

tonnes d'azote d'origine industrielle, Lors de la première crise pétrolière au début des années 1970.

La fixation de l'azote atmosphérique N<sub>2</sub> se fait par plusieurs mécanismes, dont le plus important est la fixation biologique par des micro-organismes vivant en symbiose avec les légumineuses (**Stevenson, 1984**). Consistant à la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniacque (**Dommergues et al., 1999**) selon la réaction suivante:



Cette réaction est catalysée par le complexe enzymatique: la nitrogénase (**Dixon et Wheeler, 1986**) (voir structure en annexe2), qui est formé de

- La di nitrogénase vraie appelée protéine I: est une hétéro tétramère, elle contient le cofacteur à Fer et à Molybdène. Responsable directement de la réduction de N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub>.
- La di nitrogénase réductase ou protéine II: c'est un homodimère assurant le transfert des électrons nécessaires à la réduction de N<sub>2</sub> d'un donneur à la di nitrogénase. Elle contient le Fer (**Charpy et al., 2001**).

### 2.2. La symbiose *Rhizobium*- légumineuses

lors de la symbiose *Rhizobium*- légumineuses, la fixation de l'azote atmosphérique s'effectue au niveau de la rhizosphère : volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes qui se caractérise par des compositions chimiques et biologiques très différentes de celles du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines (**Alami et al., 1999**) et par la présence des exsudats racinaires (**Moëne-locco Yvan et al., 2005**).

En réponse à des signaux chimiques émis par les racines, les flavonoïdes, les gènes nod communs et les gènes nod participent à la synthèse des signaux émis par la bactérie, les facteurs nod, (**Gamas et al., 1996**) qui vont initier des réactions de la plante conduisant à la morphogenèse des nodosités, siège de la réduction de l'azote atmosphérique en ammonium. Des portions de la membrane cellulaire des plantes autour de bactéroïdes, appelées symbiosomes sont le lieu de la fixation de l'azote (**Madigan et al., 2000**).

### 2.3. Les gènes Nod

Les gènes de nodulation chez les *Rhizobium* sont localisés sur des plasmides appelés plasmides symbiotiques (**Spaink et al., 1987**), à côté des gènes de fixation d'azote.

Dans les deux genres *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, les gènes nod sont localisés sur le chromosome. Ils sont classés en deux types:

- les gènes Nod communs (gènes nodABC et IJ).
- les gènes nod de spécificité d'hôte, sont dits de « spécificité d'hôte » lorsqu'une mutation dans l'un de ces gènes ne peut pas être complémentaire par l'ADN d'une autre espèce de *Rhizobium*, et lorsque le spectre d'hôte de la bactérie est modifié par la mutation. Mais les *Rhizobium*s peuvent acquérir la capacité d'infecter et de noduler d'autres espèces de légumineuses.

La synthèse du squelette des facteurs Nod est déterminée par les gènes communs nodABC, contrôlant les premières phases de l'infection et la nodulation (**Dénarié et al., 1996**). La protéine NodC (une N-acétylglucosaminyle transférase, ou oligochitine synthase) qui est responsable de la synthèse du squelette d'oligochitine des facteurs Nod. La protéine NodB (une N-désacétylase) responsable de la N-désacétylation de l'unité non réductrice (**John et al., 1993**), alors que la protéine NodA (une N-acyl transférase) permet l'introduction de la chaîne grasse sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice (**Atkinson et al., 1994**).

Les gènes *nodC* et *nifH* sont communs à 83 souches de *Rhizobium* représentant 23 espèces connues distribuées dans les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium* (**Laguerre et al., 2001**).

Absents chez les *Bradyrhizobium*, présents chez *Rhizobium*, les gènes régulateurs, le gène *nodD* qui code pour la protéine NodD, celle-ci s'associe avec les flavonoïdes excrétés par la plante et active la transcription des gènes Nod, ce gène est dit régulateur (**Moulin et al. 2006**).

La plante diverse dans son proche environnement une grande variété de nutriments qui, par leur nature (source de carbone, d'azote, etc...), attirent à elle des microorganismes symbiotiques et pathogènes (**Barbour et al., 1991**). Réalisant une sélection dans cette flore, en sécrétant en continu des flavonoïdes.

Lorsqu'un *Rhizobium* compatible pénètre dans sa rhizosphère, la concentration en flavonoïdes augmente. grâce à une protéine Nod, la bactérie reconnaît ce composé, il se forme un complexe qui active une séquence de gène (*nod*, *nol* et *noe*), Ces derniers sont responsables de la biosynthèse des facteurs Nod (**Schlaman et al., 1992**), c'est les *Rhizobium* qui entrent dans la rhizosphère de la plante. Toutefois la mobilité de la bactérie et le chimiotactisme jouent un rôle restreint dans la reconnaissance (**Fellay et al., 1995**). Un processus impliquant les facteurs Nod mais aussi les polysaccharides de la surface des bactéries s'installe.

### 2.4. Induction des gènes de nodulation

Présents sur un plasmide de *Rhizobium* et codant les facteurs Nod, la plupart des gènes bactériens Nod ne sont pas transcrits tant qu'ils n'ont pas été activés conjointement par la protéine NodD (produite de manière constitutive par le gène bactérien *NodD*) et des composés phénoliques (généralement les flavonoïdes) exsudés dans la rhizosphère par les racines de la plante. (**Promé et Demont., 1993**).

La nécessité des flavonoïdes inducteurs a été démontré dès 1986 dans le cas de symbiose *Rhizobium meliloti* / Luzerne où la lutéoline (une flavone), est efficace à de très faibles concentrations de l'ordre de 10nm. (**Peters., 1986**).

Avec des efficacités variables, selon leur concentration et leur structure chimique, en particulier le degré d'hydroxylation des molécules et l'espèce de *Rhizobium*, plusieurs composés phénoliques sont inducteurs des gènes Nod, mais se sont généralement des flavonoïdes dont la lutéoline chez la luzerne, l'apigénine chez le pois, ou des iso flavonoïdes comme la daidzeine chez le soja. (**Hartwing., 1990**).

Pour **Spaink. (1994)**, l'effet inducteur des flavonoïdes suit la reconnaissance spécifique entre les légumineuses et les différents *Rhizobiums*, ainsi la daidzeine et la génistéine du soja induisent spécifiquement les gènes Nod de *Bradyrhizobium japonicum* mais ils sont inactifs vis-à-vis de *Rhizobium meliloti*. Les interactions entre les différents composés phénoliques inducteurs des gènes Nod sont multiples et dépendent souvent de leurs concentrations respectives.

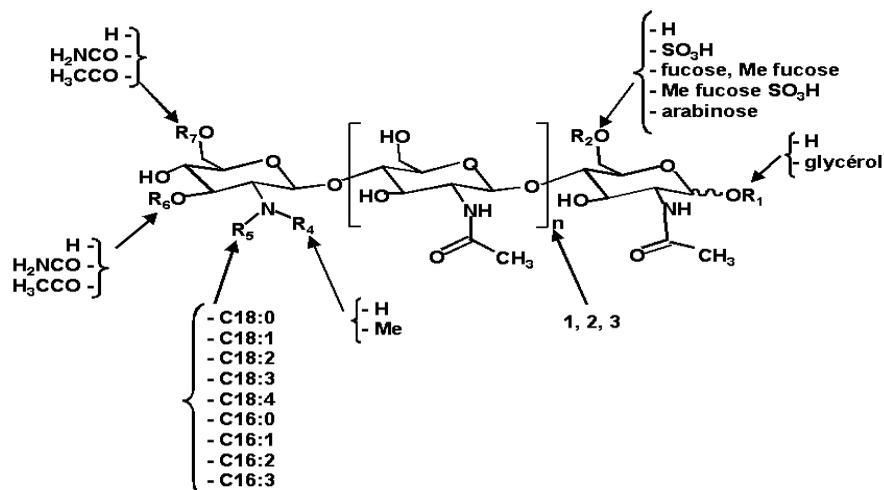
## 2.5. Les facteurs Nod

Lorsque *Rhizobium* forme des facteurs de nodulation (dits facteurs Nod) qui vont être reconnu par la plante, La symbiose bactérie / légumineuse se met en place. La structure des facteurs de nodulation a été établie pour la première fois chez *R. meliloti*. par **Le Rouge et al., en 1990**

Constitués d'une chaîne de quatre ou cinq oligomères de chitine, c'est-à-dire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ 1, 4. On les appelle lipochitooligosaccharides (LCOs) (**Cullimor et al., 1997**).

Pour **Niebel et al.,(1999)** les facteurs nod (de nature lipochitooligosaccharides) sont des médiateurs de reconnaissance entre les légumineuses et leurs symbiontes, un bon nombre de ces facteurs influent sur la membrane des cellules de l'ensemble racinaires, de la concentration cytoplasmique en calcium (diminution) et enfin de l'alcanisation externe.

Ces oligomères sont liés à une chaîne grasse poly insaturée sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice. Selon les espèces bactériennes, les substituants portés par l'atome d'oxygène en position 6 de l'unité réductrice peuvent être soit un groupe sulfate soit un groupe Me-fucosyle. On peut également rencontrer sur l'unité non réductrice, un groupe acétate en position 6 et un groupe méthyle sur l'atome d'azote (**Fig. 2**).



**Fig.2:** Schéma structural d'un facteur Nod. (**Chataigné, 2007**)

Les facteurs Nod sont des lipooligosaccharides composés de trois à cinq (3-5) bi-Acétyleglucosamines portant sur leur sucre non réducteur un groupement acyle et sur leurs deux extrémités des substituent divers (fucose, sulfate, acétyle, carbonyle)

dépendant de la souche bactérienne. Ils ne sont pourtant pas impliqués dans les étapes plus tardives, mais sont le point de départ d'une communication indispensable à la mise en place spécifique de la symbiose fixatrice d'azote,

En effet, lorsque des racines sont mises en présence des seuls facteurs Nod, les organes symbiotiques ne se forment pas où sont incomplets. Seul le recourbement du poil absorbant est visible. Il existe à la surface des bactéries d'autres composés dont le rôle est de succéder aux facteurs Nod: les polysaccharides de surface. Les plus importants travaux de revue réalisés ces dernières années, sur le rôle de ces polysaccharides sont peut être ceux de **Niehaus et al. (1998)** et de **Frayse et al. (2002)**.

### 2.6. Le processus de la nodulation

L'infection bactérienne est totalement profitable à la plante, par l'apport azoté que lui fournit la bactérie et qui joue un rôle très important dans la nutrition et la croissance des plantes, la stimulation de l'activité racinaire, l'utilisation des hydrates de carbone et l'absorption des autres éléments minéraux (**Stevenson, 1986**). Il est aussi essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (**Lamaze et al., 1990**).

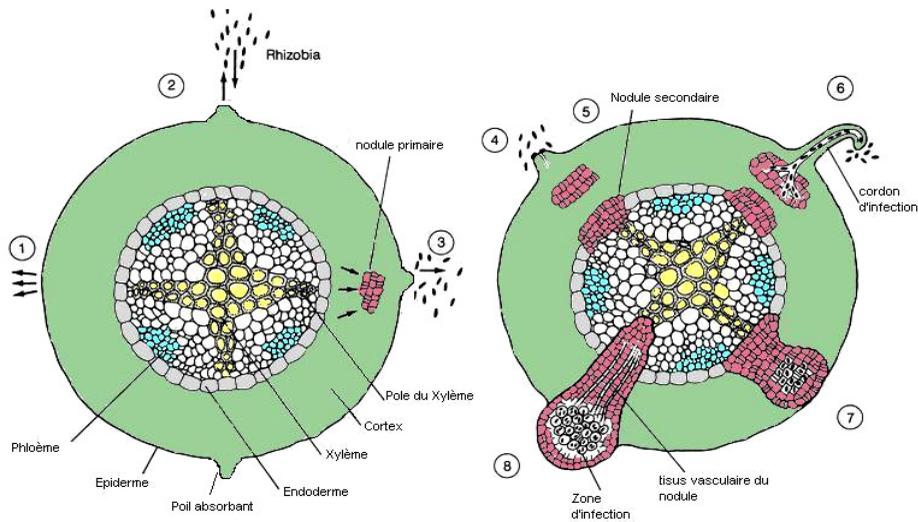
Cette infection est également bénéfique pour la bactérie sous sa forme de bactéroïde, car elle reçoit de la plante les unités sacchariques nécessaires pour produire l'énergie indispensable à la fixation de l'azote et par conséquent pour se développer. De plus, le nodule forme une niche biologique unique assurant à la bactérie une protection contre l'oxygène et évitant une quelconque compétition, rencontrée dans le milieu naturel, avec d'autres espèces bactériennes. Plusieurs messagers biologiques, comme les flavonoïdes et les facteurs de nodulation, jouent un rôle important lors de cette symbiose. (**Siquiera et al., 1991**).

#### 2.6.1. Les étapes de la nodulation

Schématiquement, plusieurs étapes constituent la symbiose *Rhizobium*-légumineuses: les plantes exsudent par leurs racines des molécules particulières, les flavonoïdes (**Caetano, 1988; Maxwell et Philips, 1990**), les *Rhizobium* vivant dans la rhizosphère de leurs plantes hôtes sont attirés par chimiotactisme vers les poils racinaires de celle-ci (**Kijne, 1992**).

Quelques hypothèses ont été avancées quant à attachement des *Rhizobium* à l'extrémité des poils absorbants des racines. La plus probable repose sur la présence à la surface des poils racinaires, des lectines (**Bohlool et Schmidt, 1974 ; Brewin, et Kardialsky, 1997**) interagissant avec les polysaccharides compatibles qui se trouvent à la surface du *Rhizobium* (**Sutherland, 1985**).

ce contact déforme les poils absorbants (**Van brussel et al., 1986**) qui se recourbent en « croses de berger » au centre desquels les *rhizobiums* se concentrent (**Vigin et al., 1993**). Les bactéries pénètrent dans les poils absorbants par une invagination de la membrane plasmique de leurs cellules. L'invagination prolonge par une structure tubulaire: le cordon d'infection (**Turgeon et Bauar, 1985; Truchet et al., 1985**) qui progresse jusqu'aux cellules du cortex racinaires où il se ramifie. **Fig.3**



**Fig.3.** Etapes de la formation d'un nodule dans une racine latéral (Chatagné, 2007)

Les étapes de la mise en place de la symbiose peuvent être énumérées dans un ordre chronologique : (1) la racine exsude des flavonoïdes; (2) les *Rhizobium*, en réponse sécrètent des facteurs Nod; (3) sous l'action des facteurs Nod, les cellules du cortex se mettent en mitose pour former le primordium nodulaire dans le méristème; (4) la bactérie s'attache à l'épiderme du poil absorbant et le poil (par croissance polaire) se recourbe sur lui-même; (5) les cellules du péricycle près des pôles du xylème se mettent en mitose; (6) il y a formation du cordon d'infection amenant la bactérie au nodule primaire; (7) les deux masses de cellules fondent en un bloc unique tandis que le cordon d'infection continue à se développer; (8) le nodule se prolonge, le raccordement vasculaire avec le stèle de la racine est mis en place. Ces lipochitoooligomères sont sécrétés dans le milieu externe et vont déclencher une série de modifications chez la plante. Ils sont impliqués dans les stades les plus précoces de la reconnaissance entre les deux partenaires et induisent les modifications du poil absorbant, débutant ainsi l'organogenèse du nodule.

Les bactéries sont ensuite libérées à l'intérieur des cellules corticales. Après avoir accueilli les bactéries, le primordium nodulaire, qui est formé grâce à la reconnaissance des facteurs Nod par la plante, va se développer pour former un nouvel organe végétal: le nodule. Les bactéries différenciées sont en bactéroïdes (Fig.4)



**Fig.4.** bactéroïdes de *Rhizobium* dans un nodule  
[www.rdg.ac.uk/AcaDepts/sb/rhizobium](http://www.rdg.ac.uk/AcaDepts/sb/rhizobium) 6 Juillet 2006

Une fois dans le primordium, ils sont capables de réduire l'azote atmosphérique en ion ammonium ceci grâce à l'action des nitrogénases produites par ces bactéroïdes. L'ion ammonium ainsi produit est assimilé en glutamine et en glutamate par l'action de deux enzymes: la glutamine et le glutamate synthétase (**Morot, 1997**). Après transamination, l'asparagine, forme principale de transfert de l'azote réduit chez les légumineuses, est produite.

La plante hôte possède des gènes responsables de la synthèse de diverses protéines spécifiques des nodules: les nodulines (globine de la léghémoglobine), (**Wittenberg, 2003**), exprimées soit à travers les assises externes de la racine, au cours de la pénétration de la bactérie; soit dans le cortex interne, pendant l'organogénèse nodulaire (**Barker et al., 1998**).

Pour protéger la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène, la léghémoglobine de coloration rouge due à la présence du fer (**Fig. 5**) présente des similitudes avec les hémoglobines animales. Elle permet au *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule (**Kundu, 2003**)

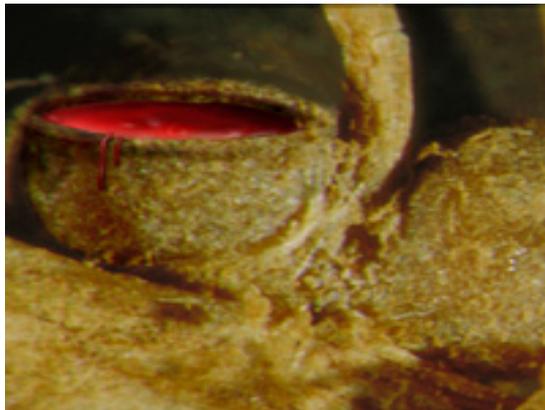


Fig.5. léghémoglobine dans un nodule

Dans un nodule de l'arachide  
[www.afdlv.org/.../arachide/conaiss/SYara.1999](http://www.afdlv.org/.../arachide/conaiss/SYara.1999).

Dans un nodule de fève  
[www.botany.hawaii.edu/.../index](http://www.botany.hawaii.edu/.../index). **2008**

### 2.6.2. Les paramètres affectant la réussite de la nodulation

Si les bactéries se trouvent dans le sol à une concentration suffisante, l'infection d'une légumineuse par son *Rhizobium* spécifique sera favorisée. La littérature de synthèse rend compte des différents facteurs biotiques (toxines végétales ou microbiennes, parasites, prédateurs..) et abiotiques (facteurs physico-chimiques: acidité, salinité..) interfèrent avec la survie des *Rhizobium*. Les principaux sont:

**Le pH:** la nodulation est plus active sur les sols neutres ou légèrement acides. les sols, riches en aluminium, affecte la formation nodulaire (**Wolff et al., 1993**),

**La salinité et la sécheresse :** contraintes majeures limitant considérablement la productivité végétale sur 40% de la surface terrestre notamment en régions méditerranéennes (**FAO, 1988**). Elles ont des effets considérables sur la croissance et la

survie des populations rhizobiennes et sur l'initiation et le fonctionnement nodulaire (Zahran et Sprent, 1986).

- L'effet du sel se manifeste par une réduction de la disponibilité en azote pour les plantes, due essentiellement à une faible nitrification (Mengel et Kirkby, 1982) et à une absorption racinaire préférentielle du chlore par rapport au nitrate (Osmond et al., 1980).

-La température: aux fortes températures la formation des nodules fixateurs d'azote est remarquablement sensible (Abaidoo et al., 1990).

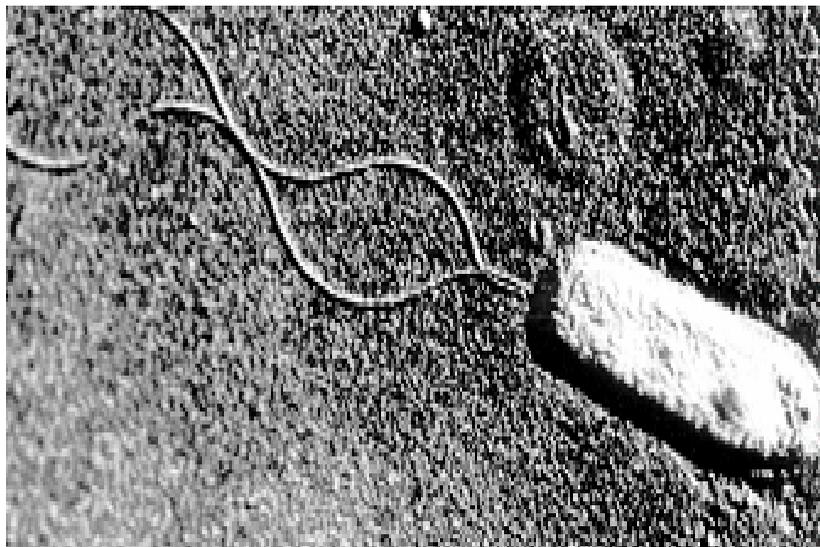
-Les insecticides et les métaux lourds: la réutilisation croissante des eaux usées traitées et l'épandage des boues résiduelles qui sont souvent chargées en métaux lourds et l'utilisation massive de divers produits chimiques (insecticides), peuvent induire des modifications de la composition structurale des bactéries et une altération de leurs propriétés symbiotiques (Giller et al., 1989).

- Les toxines microbiennes pour les terres nouvellement mises en culture (Bushby et al., 1982).

### **3. Les *Rhizobium***

#### **3.1. Morphologie et caractéristiques**

Les *Rhizobium* sont des bâtonnets Gram négatif à extrémités arrondies, asporogènes d'une longueur de 1,2 à 3,0  $\mu\text{m}$  et une largeur de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$ , contiennent souvent des granules de poly- $\beta$ -hydrox butyrate, oxydase et catalase positive, mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien 2 à 6 flagelles péritriches (Fig.6),



**Fig. 6:** Flagelles du *Rhizobium leguminosarum*  
[www.cnpab.embrapa.br/educacao/baby/rizobio.2002](http://www.cnpab.embrapa.br/educacao/baby/rizobio.2002)

Ils se trouvent isolés, en paires ou bien en amas. Ils sont aérobies à métabolisme respiratoire, mais se développent très bien en présence de faible pression en oxygène. En anaérobiose, ils sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons. Ils

sont photosynthétiques, chimioorganotrophes, certaines souches possédant une hydrogénase peuvent se développer en chimiolithotrophie en présence de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, d'une faible pression partielle en O<sub>2</sub> et de faible concentration en sels d'ammonium ou de nitrate. **Salducci (1992)**.

Comme d'autres **Morot Gaudry, (1997)** dit que si l'intérieur des nodules est rose / rouge, ceci est dû à la présence de léghémoglobine qui favorise la fixation de l'azote. Lorsque les nodules sont jeunes et pas encore fixateurs d'azote, ils sont blancs ou gris à l'intérieur

Une souche donnée infecte un nombre limité d'espèces végétales, appelé spectre d'hôte de la bactérie, c'est l'une des caractéristiques principales de l'association symbiotique

### **3.1.1. La nutrition azotée des *Rhizobium***

Les *Rhizobium sp.* peuvent assimiler un large spectre de formes organiques ou minérales d'azote et il existe une relative diversité au sein des souches d'une même espèce quant à leurs préférences, particulièrement chez les bactéries à croissance lente.

L'urée peut être assimilée par toutes les espèces du genre *Rhizobium* (**Jensen et Schroeder, 1965**).

Parmi la grande variété d'acides aminés utilisés, le glutamate est le plus adéquat **Rigaud, (1965)**; et (**Elkan et Kurik, 1968**), constatent que Les autres acides aminés largement utilisés à travers les différentes espèces sont l'asparate, la proline et l'histidine, alors que **Tan et Broughton (1981)** ajoutent que l'ammonium est utilisé par tous les *Rhizobium*.

Pour (**Elkan, 1967**), l'hydrolysate de caséine dépourvu de vitamines, est la meilleure source d'azote pour des souches de *Bradyrhizobium japonicum* et qu'aucune combinaison d'acides aminés ne parvient à le remplacer, cela laisse supposer qu'il existe un peptide agissant comme facteur de croissance.

Alors que **Vincent, (1977)**, constate que la peptone constitue une très mauvaise source d'azote à l'exception pour certains *Rhizobium* isolés de Lotonis

L'extrait de levure est la source d'azote fournie habituellement au *Rhizobium .spp*, sa capacité à stimuler la croissance de nombreuses souches résulte autant de l'apport de substrats azotés assimilables que de divers composés qu'il contient (vitamines, facteurs de croissance, micro éléments). Sa concentration doit cependant rester inférieure à 0,35% car au-delà, elle pose des problèmes de perte de viabilité et de déformation des cellules de *Rhizobium* (**Urban, 1979; Chakrabarti et al., 1981**)

Dans des conditions environnementales favorables, ces bactéries peuvent pourvoir à plus de 75 % de la consommation d'azote des cultures, le reste provenant des réserves du sol. Il est intéressant de noter que les bactéries peuvent naître dans le sol si les espèces respectives y ont été cultivées l'année précédente (**Aufhammer, 1998**).

Dans le cas de la symbiose *Rhizobium* légumineuses, la fixation de l'azote atmosphérique s'effectue au niveau de la Rhizosphère : volume du sol situé au voisinage

immédiat des racines des plantes qui se caractérise par des compositions chimiques et biologiques très différentes de celles du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines (Alami et *al.*, 1999) et par la présence des exsudats racinaires (Moenne-loccozyvan et *al.*, 2005).

### 3.1.2. Production de polysaccharides *Rhizobium*

#### 3.1.2.1 Les exo polysaccharides (E.P.S)

Lorsqu'ils se développent sur un milieu Y.E.M, Les *Rhizobium* possèdent la propriété de former une grande quantité de polysaccharides exo cellulaires (Fig.7), solubles dans l'eau (Salducci, 1992).

L'absence des exo polysaccharides bactériens provoque chez la plante la production excessive de composés phénoliques, qui colorent en brun les racines et provoquent une apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries. C'est pour cela qu'ils sont plus étudiés de tous les polysaccharides de surface. Un intérêt particulier à été porté aux succinoglycanes présents à la fois chez *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium*. Leur structure est constituée d'unités répétitives, composées en général d'hexoses (le plus souvent du glucose et du galactose) plus ou moins substitués par des pyruvates, des succinates ou des acétates. (Glucksmann et *al.*, 1993).

Selon Finan et *al.*, (2001), les gènes impliqués dans la biosynthèse des exo polysaccharides forment un groupe de gènes situés sur le méga plasmide symbiotique. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote se situe dans l'inhibition des réactions de défenses des plantes et dans la progression du cordon d'infection. (Skorupska., 2006).

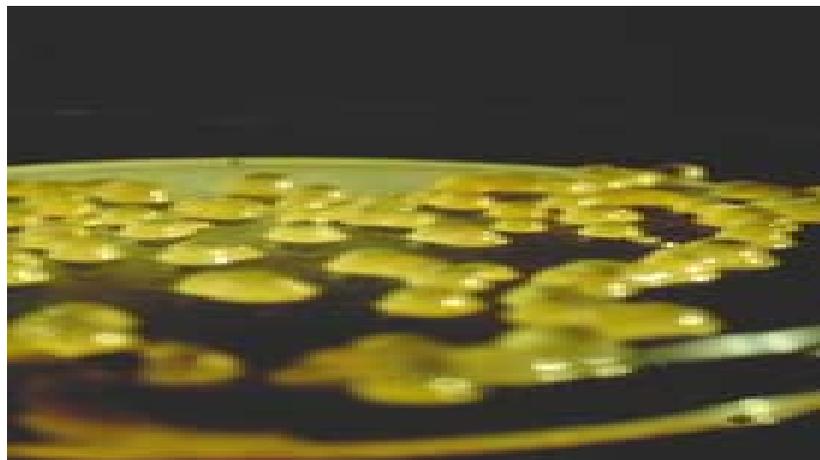


Fig. 7. Colonies muqueuses de *Rhizobium sp.*  
[www.cea-technologies.com/article.2008](http://www.cea-technologies.com/article.2008)

#### 3.1.2.2. Les polysaccharides capsulaires (KPS)

Au contact de la surface de la bactérie, se trouvent les polysaccharides capsulaires (KPS). Ceux de la famille des *Rhizobium* sont composés de sucres appartenant à la famille de l'acide 2-céto-3-désoxy-ulosonique (Reuhs et *al.*, 1993). Ces polysaccharides ont une structure analogue à celle de l'antigène KR5 d'*E. coli*, c'est pour cela que les initiales KPS leur ont été attribuées.

Peu d'études ont été réalisées pour comprendre leurs modes d'action. Ils pourraient avoir un simple rôle passif de protection lors des changements brusques

d'environnement (passage du sol à la plante) et faces aux défenses de la plante (antibiotiques de nature peptidique) et au choc alcalin. Il existe, là aussi, peu d'études sur le mécanisme de la biosynthèse des polysaccharides capsulaires chez les *Rhizobiaceae*. Etudes qui sont surtout basées sur la comparaison des gènes de *Sinorhizobium* avec ceux d'autres bactéries pathogènes (Kiss et al., 2001).

### 3.1.2.3 Les lipopolysaccharides (LPS)

Beaucoup de structures de LPS de *Rhizobium* sont partiellement décrites (Fig.8). Les LPS sont composés de trois parties:

- 1-le lipide A qui permet d'ancrer la molécule dans la bicouche phospholipidique,
- 2- un oligosaccharide de coeur,
- 3-un antigène O.

Les LPS se distinguent en deux classes suivant leurs tailles. Leur nom provient de la forme qu'ils donnent aux colonies bactériennes.

Lorsque les colonies présentent un contour irrégulier, ils sont appelés **R-LPS** : R pour « Rough » ; mais avec des contours réguliers les LPS sont dits **S-LPS**, S pour « smooth ».

La coloration en jaune, est caractéristique de ces composés en partie lipidiques. Sur un gel de polyacrylate, les R-LPS, de petites tailles, migrent le plus rapidement que les S-LPS. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote réside dans l'inhibition des réactions de défenses de la plante dans les étapes plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisés, en empêchant la mise en place du choc oxydant (Scheidle et al., 2005).

Ils ont par ailleurs un rôle dans la pénétration des bactéries dans les cellules nodulaires, lorsqu'ils sont libérés du cordon d'infection. Les composés sont aussi des agents de cohésion membranaire. Pour cette raison, les LPS semblent nécessaires à la survie de la bactérie lors de sa transformation en bactéroïde (changement de forme et de taille)

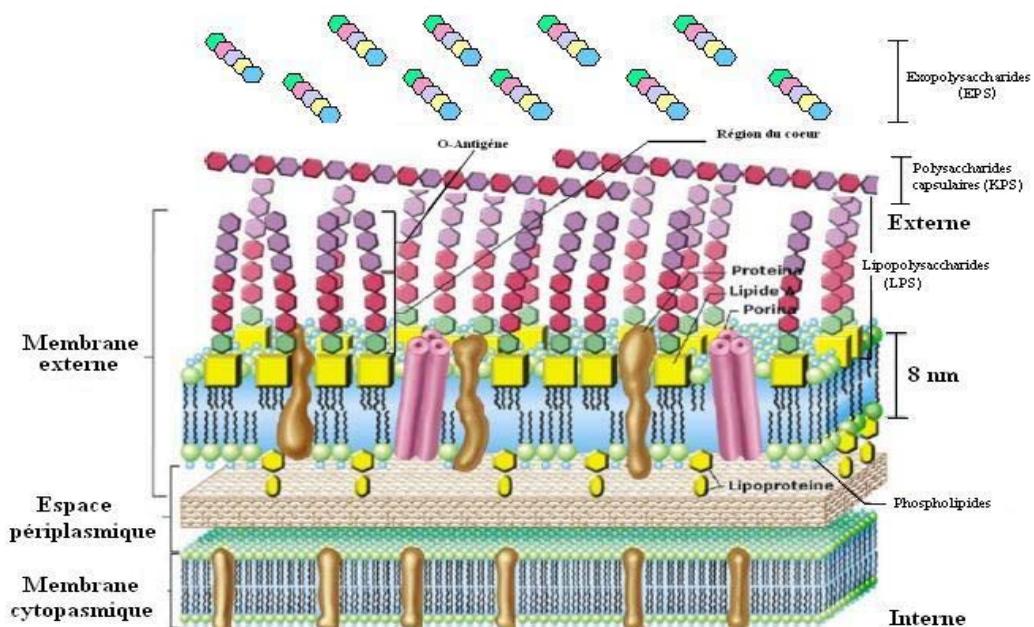


Fig.8. Schéma de la surface d'une paroi de *Rhizobium*. [www.ncbi.nlm.nih.gov/.../1998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../1998)

### 3.2. Les avancées de la taxonomie des *Rhizobium*

du fait de l'abandon du spectre d'hôte comme important critère pris en compte, pour la définition des espèces et de l'adoption des critères généralement retenus pour la classification bactérienne, Ces bactéries ont vu leur classification sans cesse remaniée, surtout ces dernières années grâce à la taxonomie poly phasique qui se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (protéines, acides gras, ADN...). Les *Rhizobium* sont constitués de 12 genres. A l'addition, il est important de noter qu'il existe des genres qui appartiennent à la classe des *Bétoprotéobactéries* et qui fixent l'azote et aussi des espèces non *rhizobiales* par exemple *Rhizobium radiobacter* (autrefois appelé *Agrobacterium tumefaciens*, qui ne fixent pas l'azote mais contiennent un plasmide symbiotique (Velázquez et al., 2005).

L'étude des gènes codant pour l'ARN ribosomique 16s a démontré la proximité phylogénétique entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* d'une part, et entre *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas* et *Nitrobacter* d'autre part (Willems et Collins, 1992; Turk et Keyser, 1992; Willems et Collins, 1993; Yanagi et Yamasato, 1993; Sawada et al., 1993; Vanerkum et al., 1996)

Ces relations phylogénétiques ont été confirmées par d'autres techniques de taxonomie complémentaires, permettant de caractériser les bactéries à différents niveaux de la cellule (taxonomie dite poly phasique), ce qui a permis d'aboutir à une classification plus précise (Young, 1994; Young et Haukka, 1996).

Les *Rhizobium* ne forment pas un groupe taxonomique homogène. Ils sont répartis en quatre genres différents: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sino rhizobium* et *Azorhizobium*. (Lindstrom et al., 1995; Jarvis et al., 1997). Au Maghreb (Maroc, Tunisie, Libye), les isolats d'Acacia forment plusieurs groupes de *Rhizobium* proches de *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et de *Mesorhizobium* (Khbaya et al., 1995).

En effet, une même légumineuse peut être nodulée par différentes espèces de *Rhizobiums* (le soja est nodulé par *S. fredii* et *B. japonicum*) tandis qu'une même espèce peut regrouper des bactéries de spécificités d'hôte différentes (*R. leguminosarum* est divisé en trois biovars *bv. viciae*, *bv. trifolii* et *bv. phaseoli*). Ce qui a permis d'aboutir à une classification plus précise (Young et al., 1996). (Voir annexe 2)

Ainsi, la classification actuelle des bactéries nodulant les légumineuses basée sur les séquences de l'rARN 16S paraît satisfaisante. Un arbre phylogénique a pu être construit (Fig. 9). Nous pouvons observer que des souches telles que *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* appartenait précédemment au même genre *Rhizobium*, malgré leur éloignement génétique Leur classification, à l'image de la taxonomie bactérienne, est basée sur une approche poly phasique qui ne retient plus les propriétés symbiotiques comme critère taxonomique (Graham et Parker, 1991).

Par ailleurs, certaines branches d'*Agrobacterium* se trouvent à présent mêlées avec des *Rhizobium* (Fig.9), engendrant une classification nouvelle pour ces genres pour laquelle une nomenclature s'est imposée. La nouvelle nomenclature a permis de classer les bactéries nodulant les légumineuses en 12 genres différents: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*,

*Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Burkholderia* et *Ralstonia* (Zakhia et al., 2006).

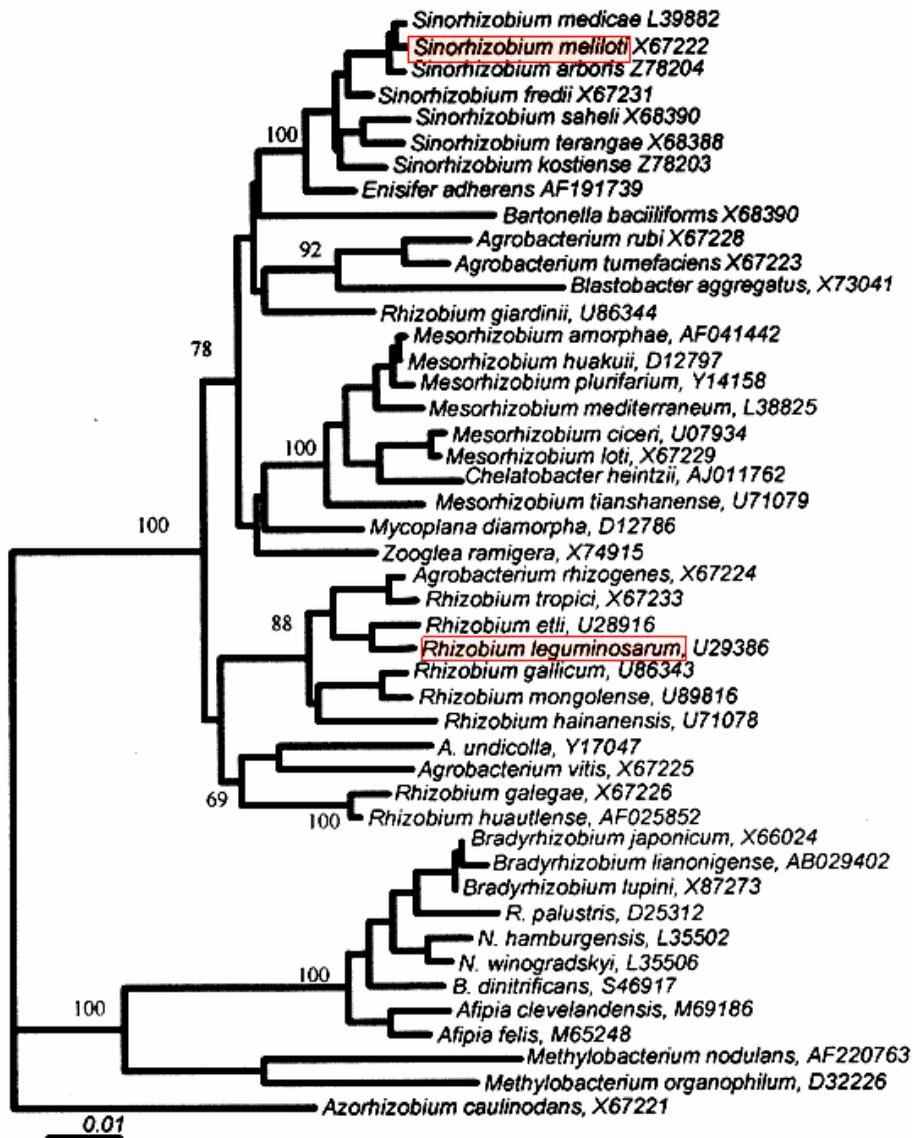


Fig. 9. Arbre phylogénique des *Rhizobium* basé sur le séquençage du rARN 16S. (Terefework, 2002)

### 3.2.1. Le concept du groupe d'inoculation croisée

C'est en 1888, qu'Hellriegel et Wilfarth ont clairement établi l'assimilation de l'azote atmosphérique par les nodules des légumineuses.

Beijerinck (1888) a isolé les bactéries symbiotiques et a confirmé leur capacité à fixer l'azote. Il a proposé pour ces bactéries le nom de *Bacillus radicola*.

En **1889**, **Frank** a renommé ces organismes du nom de *Rhizobium*, l'ensemble des souches étant considérées comme appartenant à une seule espèce. Plus tard des études d'inoculations croisées ont mis en évidence la spécificité plante hôte-*Rhizobium* qui s'exprime à la fois par le pouvoir de nodulation du *Rhizobium* (infectivité) et la capacité de former de nodules fixateurs d'azote (efficacité). Un groupe d'inoculations croisées est constitué par l'ensemble des plantes hôtes nodulées par les mêmes souches bactériennes et une espèce de *Rhizobium* étant définie par l'ensemble des souches infectives sur les plantes appartenant à un même groupe d'inoculation croisée. Ces résultats ont mis en évidence : *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseolis*, *R. lupini* et *R. japonicum* (**Fred et al., 1932**). Les souches non incluses dans ces six espèces ont été classées en 10 groupes correspondant à des légumineuses tropicales de genres très divers. Ils furent nommés *Rhizobium. sp. Cowpea* (**Salducci, 1992**)

### 3.2.2. rejet du concept de groupe d'inoculation croisée

parmi les plus importantes de plus de 500 raisons que **Wilson (1944)** a publié pour abandonner le concept de groupe d'inoculations croisées : la faible diversité des plantes hôtes testées et les nombreux exemples de promiscuité symbiotiques mises en évidence dans les interactions plantes-*Rhizobium* par exemple le haricot (*Phaseolus vulgaris*) est nodulé par *Rhizobium loti* et par une grande gamme d'isolats venant de différentes légumineuses tropicales (**Graham et Parker, 1964**) et inversement, certaines souches peuvent noduler des plantes légumineuses appartenant à des genres différents de leur plantes hôtes d'origine (**Lewin et al., 1987**).

### 3.3. Les genres des *Rhizobiums*

#### 3.3.1. le genre *Bradyrhizobium*

C'est **Lohnis et Hansen** qui ont suggéré En, **1921** la division du genre *Rhizobium* en deux groupes selon la vitesse de croissance en culture pure.

- Le groupe des *Rhizobium* à croissance rapide est constitué de souches isolées du pois, du trèfle, de la luzerne et du haricot qui forment des colonies bien développées sur milieu solide après trois à cinq jours de culture
- le groupe des *Rhizobium* à croissance lente comprend des souches isolées du soja, du lupin, et de niébé, qui nécessitent cinq à sept jours de culture pour atteindre le maximum de leur croissance.

**Graham (1964b)** a remarqué des différences importantes portant sur la nutrition carbonée entre les deux groupes de *Rhizobium* ont été soulevées. Les espèces à croissance rapide sont capables de métaboliser une grande variété d'hexoses, de pentoses, de disaccharides, de tri saccharides et d'acides organiques, tandis que les espèces à croissance lente sont incapables de métaboliser la plupart des disaccharides, des tri saccharides et des acides organiques

D'autre part (**Graham, 1964a**) a remarqué que les espèces *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* et *R. trifolii* étaient voisines et constituaient une seule espèce.

La forme primitive des *Rhizobium* pour, **Norris (1965)** est la forme à croissance lente alcalinisant le milieu, associée aux légumineuses d'origines tropicales ou les sols sont généralement acides a classé des souches de *Rhizobium* selon leur capacité à acidifier ou alcaliniser.. Par contre les *Rhizobium* à croissance rapide acidifiant le milieu de culture, représentaient une forme plus évoluée qui est adaptée aux sols fertiles et à pH plus élevés des zones tempérées.

Ayant une composition en G+C variant entre 58,6 et 63,1%, les *Rhizobium* à croissance rapide possèdent deux à six flagelles péritriches, alors que les *Rhizobium* à croissance lente possèdent des flagelles polaires ou subpolaires et présentent et ont un pourcentage en G+C compris entre 62,8 et 65,5%. Critères permettant de séparer ces deux groupes selon **De Ley et Russel (1965)**

En **1969, Graham**, analysant les résultats de plusieurs études sérologiques a défini trois groupes sérologiques: **1-R. leguminosarum**, *R. trifolii* et *R. phaseoli* ; **2-R. meliloti** ; **3-R. japonicum** et *R. lupini*.

Ces groupes sérologiques correspondaient aux groupes définis par l'étude de taxonomie numérique de **Graham (1964b)**, par l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines cellulaires (**Roberts et al., 1980**) et plus tard par Les études des homologies ADN/ADN (**Crow et al., 1981**; **Hollis et al., 1981**).

Ce qui conduit **Jordan (1982)** à proposer le nom *Bradyrhizobium* aux bactéries à croissance lente qui ont un temps de doublement supérieur à six heures dont la seule espèce définie est *Bradyrhizobium japonicum*, capable de former des nodosités efficaces sur les racines des espèces de Soja (*Glycine*), Siratro (*Macroptilium atropurpureum*), les autres souches de *Bradyrhizobium* non classées ont été nommées *Bradyrhizobium sp.* suivies du nom de la plante hôte qu'ils nodulent entre parenthèse. Exemple *B. sp. (Lupinus)* pour le *Bradyrhizobium* nodulant le lupin.

le genre *Rhizobium* comportait les bactéries à croissance rapide qui ont un temps de doublement inférieur à six heures dont les espèces représentatives sont *R. leguminosarum*, qui est composé lui même de trois biovars (*R. leguminosarum bv. trifolii*, *bv. phaseoli* et *bv. viceae*), *R. meliloti*, *R. loti*, *R. tropici*, *R. galegae*, *R. huakii* et *R. fredii*, ces espèces possèdent au moins un mégaplasmide de 90 à 250 Md (**Masterson et al., 1982**) appelé aussi plasmide symbiotique (**pSym**) (**Prakash et Atherly, 1986**) et qui héberge :

- Les gènes responsables de la nodulation: *gène nod*
- Les gènes responsables de l'activité nitrogénase: *gène nif*
- Les gènes responsables de la fixation: *gène fix*

Actuellement le genre *Rhizobium* contient 17 espèces et le genre *Bradyrhizobium* contient six espèces (**Tab.5**).

**Tab.5.** les différentes espèces des deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Le genre	Genre – espèce
Le genre <i>Rhizobium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>R. leguminosarum</i></li> <li>• <i>R. galegae</i> (Lindström, 1989).</li> <li>• <i>R. tropici</i> (Martínez et al., 1991).</li> <li>• <i>R. etli</i> (Segovia et al., 1993).</li> <li>• <i>R. gallicum</i> et <i>R. giardinii</i> (Amarger et al., 1997).</li> <li>• <i>R. hainanense</i> (Chen et al., 1997).</li> <li>• <i>R. huautlense</i> (Wang et al., 1998).</li> <li>• <i>R. mongolense</i> (Berkum et al., 1998).</li> <li>• <i>R. undicola</i> (Young et al., 2001) autrefois <i>Allorhizobium undicola</i> (de Lajudie et al., 1998).</li> <li>• <i>R. yanglingense</i> (Tan et al., 2001).</li> <li>• <i>R. indigoferae</i> (Wei et al., 2002).</li> <li>• <i>R. sullae</i> (Squartini et al., 2002).</li> <li>• <i>R. loessense</i> (Wei et al., 2003).</li> <li>• <i>R. daejeonense</i> (Quan et al., 2005).</li> <li>• <i>R. lusitanum</i> (Valverde et al., 2006).</li> <li>• <i>R. cellulosilyticum</i> (García et al., 2007).</li> </ul>
Le genre <i>Bradyrhizobium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. japonicum</i></li> <li>• <i>B. elkanii</i> (Kuykendall et al., 1993).</li> <li>• <i>B. liaoningense</i> (Xu et al., 1995).</li> <li>• <i>B. yuanmingense</i> (Yao et al., 2002).</li> <li>• <i>B. betae</i> (Rivas et al., 2004).</li> <li>• <i>B. canariense</i> (Vinuesa et al., 2005).</li> </ul>

### 3.3.2. Le genre *Azorhizobium*

**Dreyfus** et **Dommergues** (1981) ont remarqué que des légumineuses appartenant au genre *Neptunia*, *Aeschynomene* et *Sesbania* ont la particularité d'être nodulées à la fois sur le système racinaire et le système caulinaire

Cette particularité a été élucidée par **Dreyfus** et al. (1983) et **Gebhardt** et al. (1984) qui ont montré l'existence de deux types de souches parmi les microorganismes impliqués dans ces symbioses: des souches qui fixent l'azote atmosphérique et nodulent les tiges et les racines de *Sesbania rostrata*, absentes sur *Neptunia* et *Aeschynomene*; et des souches qui ne fixent pas l'azote et ne nodulent que les racines de *Sesbania rostrata*.

En essayant de préciser la position taxonomique des souches isolées de *Sesbania*, **Dreyfus** et al. (1988) ont procédé à la comparaison d'une vingtaine de souches nodulant les tiges et les racines et 9 souches qui ne nodulent que les racines avec des souches de référence appartenant aux différentes espèces de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Sur la base des homologues ADN/ADN et ADN/ADN, des profils protéiques et des dizaines de tests phénotypiques ils ont affirmé que les souches nodulant uniquement les racines de *Sesbania* appartiennent au genre

*Rhizobium*, ils ont proposé le nouveau genre *Azorhizobium* contenant une seule espèce *Azorhizobium caulinodans*, pour les souches nodulant les racines et les tiges de *Sesbania*. Ces bactéries possèdent des caractères communs au *Rhizobium* (le temps de génération de 3 à 5 heures et la présence du plasmide pSym) et au *Bradyrhizobium* (alcalinisation du YEM), n'assimilent que le glucose, mais l'hybridation ADN/ADN les rapprochent plus du genre *Bradyrhizobium*. Actuellement ce genre est divisé en deux espèces: *Azorhizobium caulinodans* et *Azorhizobium doebereineriae* (Moreira et al., 2006).

### 3.3.3. Le genre *Sinorhizobium*

En 1982, Keyser et al. ont décrit les *Rhizobium* qui fixent l'azote et nodulent des génotypes de soja cultivés en Chine. Ces bactéries présentaient des propriétés physiologiques et culturales qui étaient typiques des souches du genre *Rhizobium* (Sadowsky et al., 1983 ; Stowers et Eaglesham, 1984), alors que les souches isolées de soja étaient rattachées à l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Heron et Pueppke, 1984).

Pour vérification (Scholla et al., 1984; Scholla et Elkan, 1984) par des techniques d'hybridation ADN/ADN, sur cinq souches isolées des cultivars chinois de soja et de souches représentatives des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, ont montré que les bactéries d'origine chinoise pouvaient être séparées en deux groupes proches mais éloignés des autres espèces de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* testées ils ont confirmé l'existence d'une nouvelle espèce: *Rhizobium fredii*, en utilisant des tests d'hybridation, d'inoculation croisée de typage à l'aide des phages.

Chen et al., (1988) ont repris neuf souches qui sont décrites comme *R. fredii* et ils ont ajouté 24 autres souches de *Rhizobium* à croissance rapide pour étudier la taxonomie numérique. Elles ont été comparées avec 25 souches appartenant au genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Agrobacterium*. Une faible homologie a été observée entre *R.fredii* et les souches de références ce qui a conduit à proposer le nouveau genre *Sinorhizobium* (En 2001 l'équipe de Barnet a réalisé séquençage nucléotidique complet du mégaplasmide pSymA de *S. meliloti* (annexe 2), qui regroupe deux espèces: *S. fredii* et *S. xinjiangensis*.

Mais selon la commission de la taxonomie des *Rhizobium* et *Agrobacterium*, le genre *Sinorhizobium* et *Ensifer* (Casida, 1982) appartenant au même taxon (Lindstrom et Martinez, 2002), Le genre *Ensifer* prend la priorité donc toutes les souches du genre *Sinorhizobium* doivent être nommées comme *Ensifer*.

Young (2003) a proposé de transférer *Sinorhizobium fredii* dans le genre *Ensifer* et il a suggéré aussi que *Sinorhizobium morelense* est le synonyme d'*Ensifer adhaerens*.

Martenz et al., (2007) ont refusé que *Sinorhizobium morelense* est le synonyme d'*Ensifer adhaerens*, par contre ils représentent deux espèces différentes du genre *Ensifer*.

Actuellement ce genre est divisé en 15 espèces :

- *E. fredii*.

- *E. xinjiangensis*.
- *E. abri*
- *E. mexicanum*.
- *E. adhaerens* (Casida, 1982).
- *E. teranga* et *E. saheli* (De Lajudie et al., 1994).
- *E. meliloti* (Young, 2003).
- *E. medicae* (Rome et al., 1996).
- *E. arboris* et *E. kostiense* (Nick et al., 1999).
- *E. kummerwiae* (Wei et al., 2002).
- *E. indiaense* et *Sinorhizobium morelense* (Wang et al., 2002).
- *Ensifer americanum* (Toledo et al., 2004).

#### 3.3.4. Le genre *Methylobacterium*

Décrit par Patt et al. en 1976, il est divisé en 28 espèces avec une seule espèce rhizobiale : *M. nodulans*. Cette espèce, en plus de sa capacité de pousser sur le méthanol qui est la caractéristique de tous les *Methylobacterium*, elle porte deux gènes codant pour les enzymes clés de la méthylotrophie et la nodulation. Le gène *mxoF* code pour la sous unité alpha du méthanol déshydrogénase et le gène *nodA* code pour une acyltransférase impliquée dans la biosynthèse des facteurs Nod (Jourand et al., 2004; Sy et al., 2001).

#### 3.3.5. Le genre *Phyllobacterium*

Appartient à la famille des *Phyllobacteriaceae*, (Knösel, 1984). avec 8 espèces dont une espèce rhizobiale *R. trifolii* (Valverde et al., 2005).

#### 3.3.6. Le genre *Herbaspirillum*

il contient aujourd'hui 10 espèces avec une espèce rhizobiale : *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003). Il était proposé en 1986 par Baldani et al., pour une unique espèce, *H. seropedicae*.

#### 3.3.7. Le genre *Cupriavidus*

Décrit par Makkar et Casida (1987), il appartient à la classe des *Béta*proteobactéria avec des espèces qui étaient classées dans le genre *Wautersia* et au paravent dans le genre *Ralstonia*. Avec 11 espèces dont une seule espèce rhizobiale : *C. taiwanensis* (Chen et al., 2001).

#### 3.3.8. Le genre *Ochrobactrum*

Proposé par Holmes et al. en 1988, actuellement il comprend deux espèces : *O. lupini* (Trujillo et al., 2006). et *O. cytisi* (Zurdo - Piñeiro et al., 2007).

#### 3.3.9. Le genre *Burkholderia*

Décrit par Yabuuchi et al. (1993); il appartient à la classe des *Béta*protéobactéries et contient 58 espèces dont cinq espèces rhizobiales:

- *B. ccepacia* (Yabuuchi et al., 1993).
- *B. caribensis* (Achouak et al., 1999).
- *B. phymatum* et *B. tuberum* (Vandamme et al., 2003).
- *B. mimosarum* (Chen et al., 2006).

### 3.3.10. Le genre *Devosia*

Décrit par **Nakagawa et al. (1996)**, il appartient à la classe des  $\alpha$ -protéobactéries. Ce genre contient 07 espèces, dont une seule espèce rhizobiale: *Devosia neptuniae* (**Rivas et al., 2003**).

### 3.3.11. Le genre *Mesorhizobium*

Décrit par **Jarvis et al. en 1997**, il contient 12 espèces:

- M. loti* autrefois *Rhizobium loti* (**Jarvis et al., 1982**).
- M. huakuii* autrefois *Rhizobium huakuii* (**Chen et al 1991**).
- *M. ciceri* autrefois *Rhizobium ciceri* (**Nour et al., 1994**).
- *M. mediterraneum* autrefois *R. mediterraneum* (**Nour et al., 1995**).
- *M. tianshanense* autrefois *R. tianshanense* (**Chen et al., 1995**).
- *M. plurifarium* (**de Lajudie et al., 1998**)
- *M. amorphae* (**Wang et al., 1999**).
- M. chacoense* (**Velázquez et al., 2001**).
- *M. septentrionale* et *M. temperatum* (**Gao et al., 2004**)
- *M. thiogangeticum* (**Ghosh et Roy, 2006**)
- *M. albiziae* (**Wang et al., 2007**).

### 3.4. Exemples de bactéries et leurs plantes hôtes

Comme précédemment décrit la spécificité de l'hôte reste une des caractéristiques de la taxonomie de ces microorganismes (voir **Tab.6**)

**Tab.6.** Quelques exemples de bactéries et légumineuses associées

Genre espèces	Plantes hôtes	Référence
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia, Lens, Pisium</i>	<b>Jordan, 1984.</b>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<b>Martínez et al., 1991.</b>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	<b>Lindström, 1989.</b>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<b>Segovia et al., 1993.</b>
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	<b>Jordan, 1982.</b>
<i>B. elkanii</i>	<i>Arachis hypogaea, Glycine max</i>	<b>Kuykendall et al., 1993.</b>
<i>Azor. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<b>Dreyfus et al. ; 1988.</b>
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	<b>Rivas et al., 2003.</b>
<i>Methylob. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i>	<b>Sy et al., 2001.</b>
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<b>Valverde et al., 2003.</b>
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Medicago, Trigonella, Melilotus</i>	<b>De Lajudie et al., 1994.</b>
<i>Azor. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	<b>Moreira et al., 2006</b>
<i>Ensifer terangaie</i>	<i>Sesbania, Acacia</i>	<b>De Lajudie et al., 1994.</b>

#### 4. Dépollution et lutte biologique

Selon **Fort Mann, (2000)**, Les traitements chimiques sont déconseillés dans les systèmes d'agriculture biologique et ne sont autorisés que s'ils sont utiles pour éviter la perte de cultures.

L'agriculture biologique évite l'utilisation d'engrais et de pesticides de synthèse, de régulateurs de croissance et d'additifs alimentaires pour bétail. (**Litterick et Watson, 2003**): Elle utilise la rotation des cultures, les résidus de récolte, les déjections animales (fumier), les engrais verts, les déchets organiques extérieurs à l'exploitation, mais aussi des méthodes biologiques de lutte antiparasitaire et antifongique pour maintenir la productivité, l'ameublissement du sol, dépolluer, fournir les éléments nutritifs et lutter contre les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (**Litterick et Watson, 2003**).

Les recherches dans ce domaine visent en plus, l'isolement et l'identification de microorganismes possédant une grande capacité de dégradation des substances polluantes des sols (nitrates, métaux lourds, composés organiques tel que les biphényle polychloré (PCB)). (**David et al., 1998**); des cas concrets de dépollution de sites contaminés par l'atrazine et par les hydrocarbures bruts sont rapportés dans la littérature .

des baculovirus, des champignons (exemple, *Metarhizium anisopliae*) et des nématodes entomopathogènes destinés à la lutte contre les insectes , sont appliqués en tant que biopesticides de la même manière que les pesticides chimiques. On utilise une formulation huileuse des conidies de *Metarhizium anisopliae varacridum*, qui peut être appliquée à un environnement acide. Bien qu'il agisse plus lentement qu'un insecticide chimique (contre les criquets et les sauterelles), ce biopésteicide tue 90 % du parasite en 7-12 jours sans décimer les ennemis naturels. Des champignons antagonistes, tels que *Trichoderma spp.*, sont également utilisés pour lutter contre les agents pathogènes des plantes (**Thomas et al., 2003**).

selon **Claude et al., (2007)**, la mise en œuvre de la lutte biologique requiert un savoir faire approfondi des problèmes phytosanitaires (insectes et maladies) et de la possibilité d'y faire face avec des agents naturels de lutte (prédateurs, parasitoïdes, compétiteurs, entomopathogènes, etc..).

##### 4.1. Lutte biologique contre les mauvaises herbes et les parasites

L'utilisation à long terme, des produits chimiques a eu des effets négatifs (**Entrup et Oehmichen, 2000**), ce qui a ouvert la voie à la lutte biologique, bien qu'elle ne représente qu'un faible part des technologies agricoles (1-2 %), elle est préconisée comme alternative à la méthode chimique. Elle inclut deux approches, l'une dite classique, l'autre fondée sur les mycoherbicides. (**Negrila; 2005**). Elle s'est révélée efficace, écologique et économique, dans des secteurs comme les pommeraies, maïs, coton, canne à sucre, soja, vigne et serres, (**van Lenteren, 2003**).

En Amérique latine, la lutte contre les nématodes dans les plantations de bananiers, repose essentiellement sur l'application de nématicides granulés à base d'organophosphates et de carbonates (**Marín, 2005**).

Pour augmenter l'activité sur les légumineuses, et donc accroître les possibilités de lutte biologique contre *Radopholus similis*, de nouveaux agents de lutte biologique, notamment des champignons endophytes et même des Rhizobactéries, font actuellement l'objet d'études pour une application en champ.

### 4.2..Développement de la lutte biologique par les bactéries.

Les essais réalisés en lutte microbiologique ont abouti à la mise au point de préparations dont le développement est aujourd'hui très reconnu (**Dayan, 1988**)

Des études concluantes ont abouti à la mise au point de préparations à base de bactéries dont certaines sont largement diffusées; c'est le cas des préparations contenant le *Bacillus thuringiensis* (**David et al., 1998**). Le bio insecticide à base de *Bacillus thuringiensis* représente plus de 2 % du marché mondial des insecticides.

Sauf que **Arnaud et al., (1995); Singh et al., (2000); Xavier et Boyetchko (2002); Whipps (2004)** conseillent de relativiser l'ensemble des résultats, car plusieurs des mécanismes d'action rapportés jusqu'à présent agissent de manière indirecte sur les affections parasitaires et fongiques.

### 4.3. *Rhizobium* et lutte biologique

Par la présence du microsymbiote les légumineuses obtiennent un bénéfice nutritif, et deviennent aussi plus résistantes à certaines infections. *Rhizobium meliloti* et le *Bradyrhizobium japonicum* protègent, respectivement, la luzerne, et le soja du *Fusarium oxysporum* (**Bordeleau, 1989**). L'effet protecteur serait réalisé par une compétition nutritive entre le *Rhizobium* et l'agent pathogène, envers la source de carbone principalement.

**Ehteshamul-haque et al., (1992)** rapporte que dans d'autres travaux *Rhizobium meliloti* a inhibé la croissance de *Macrophomina pimedina*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium solani* in vitro.

Dans des études en champ, *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *B. japonicum* ont réduit la sévérité de l'infection par *M. phaeofina*, *R. solani* et *Fusarium* spp, de certaines légumineuses et non légumineuses. Ainsi des *Rhizobium* transgéniques, *R. leguminosarium biovar Viciae* et *R. leguminosarium biovar Trifolii* ont protégé les nodules du petit pois et de la fèverole de l'attaque des larves de *Sitona flavescens*. Ces souches contiennent des fusions avec la séquence codante pour la protéine insecticide de *Bacillus subtilis* (**Skat et al., (1999)**)

Le *Rhizobium* est capable de persister dans le sol de manière saprophytique même en absence de sa plante hôte. Sa survie est possible grâce à l'expression de

certaines des traits compétitifs, nécessaires pour la protection de sa niche écologique

### 5. Compétences biotechnologiques du *Rhizobium*

Les sidérophores sont reconnus être impliqués dans l'effet bénéfique des certaines Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et inhibant la croissance radiale de certains champignons phytopathogènes. **Pollack et al., (1970)** et **(Guennot et al., (1990),)** ont vérifié l'implication de la production des sidérophores dans des antagonismes rhizobium champignons.

chez le pois et le haricot, une amélioration de l'assimilation du fer par la racine suivie d'une augmentation de la synthèse de chlorophylle, grâce à la production de l'agrobactine par *Agrobacterium* et la production des sidérophores par les *Rhizobium* **Becker et al., (1985)**. Des bactéries comme *Pseudomonas putida* et *Serratia* entraînent une résistance chez le concombre causé par *Fusarium oxysporum* (**Liu et al., 1995**).

Plusieurs mécanismes ont été élucidés. Concernant les interactions entre les plantes et les *Rhizobium* bénéfiques ou entre *Rhizobium* et les pathogènes.

#### 5.1. Antagonisme entre *Rhizobium* et flore microbienne

Certains champignons sont phytopathogènes pour les légumineuses par exemples : *Penicillium Sp*, *Rhizopus stolonifère*, *Trichoderma* et *F. oxysporum*. L'activité antifongique des différentes souches de *Rhizobium* a été testée dans différentes interactions entre les communautés de la flore Rhizosphérique qui se peut résumer à l'antagonisme et la compétition.

##### 5.1.1. Antibiose

C'est une forme d'antagonisme qui se produit quand une espèce bactérienne sécrète des toxines pour les espèces situées à sa proximité. Ainsi les substances antifongiques peuvent induire un effet fongistatique, fongicide ou mycolytique. (**Brisbane., 1987**).

Le *Rhizobium* producteur de rhizobactine et *Agrobacterium radiobacter* K84 producteur de l'agrocine 84 avec succès pour la protéger contre la tumeur du collet (**Ryder, 1990**). Les souches productrices d'antibiotiques (comparaison avec des mutants déficients) ont été impliquées dans le phénotype d'inhibition de la Croissance d'agents pathogènes, (**Kempff et Wolf. 1989**) ; **Faishan et al., 1990**)

##### 5.1.2. Hydrolases

Les hydrolases (des Rhizobactéries) extracellulaires sont associées à l'inhibition des champignons phytopathogènes. On a démontré la lyse de la paroi (chitine et les 1,3-glucanes sont des composants majeurs de la paroi cellulaire de plusieurs champignons) in vitro par des chitinases ou des  $\beta$ -glucanases bactériennes (**Kobayashi et al., 1974**; **Sietsrna et Wesel, 1979**; **Skujins et al., 1995**)

Les gènes de synthèse de la chitinases ont été clonés chez *Bradyrhizobium*, ce qui a permis de muter le locus et d'effectuer une mutagenèse dirigée par recombinaison réciproque avec le locus sauvage. Le mutant montre une production réduite de chitinases, une diminution de l'inhibition de l'élongation du tube germinatif fongique, et une protection réduite des plants de pois contre le *Fusarium oxysporum* (Jones et al., 1986)

### 5.1.3. Compétition

L'inhibition du *Fusarium oxysporum* par *Agrobacterium radiobacter* est associée à un rapport de compétition élevé (Marshall et Alexander, (1960)

Des antagonismes de nature compétitive pour certaines maladies de plantes comme celles causées par le *Rhizoctonia solani* ont été constatés (Garrett, 1965).

Antoun et al., (1978) ont prouvé que l'antagonisme entre le *Fusarium oxysporum* var. *avenaeum* et *Rhizobium meliloti* est lié à la concentration de glucose d'où une compétition sur le nutriment. Des bactéries ne produisant pas d'enzymes lytiques mais des substances antifongiques, inhibent la croissance mycélienne, inhibent la germination des oospores du *Phytophthora sp*, en les privant de certains éléments nutritifs (Elad et Chet, 1987).

Dans le même contexte, lorsque les graines sont enrobées par des *rhizobiums*, les exsudats des graines de coton perdent leur action stimulante de la germination des sporanges de *Phytophthora*. L'addition d'exsudats concentrés traités avec du E. cloacaz à des exsudats frais non traités n'a pas réduit l'activité stimulante de ces derniers, ce qui indiquait l'absence de substances stimulantes plutôt que la présence d'inhibiteurs dans ces exsudats (Nelson et Craft, (1991).

#### 5.1.3.1. Sidérophores et compétition

des ligands de faible masse moléculaire spécifiques au fer, Leur biosynthèse est régulée par la disponibilité du fer et leur fonction est de fournir cet élément à la cellule (Lankford,1973).

Sont classés en deux groupes; les phénols-catéchols et les hydroxamates. Les hydroxamates sont le seul type produit par les champignons, alors que les bactéries contiennent une plus grande diversité.

Le fer est capable de participer dans les réactions d'oxydoréduction (grâce à ses deux valences stables). On le retrouve dans les enzymes héminiques, tels les cytochromes et les hydroperoxydases, ainsi que chez la plupart des ribonucléases. Il est abondant dans le sol sous forme d'oxydes de fer. C'est un facteur limitant pour la croissance de la flore bactérienne et de celle des plantes (Schwertmann. et Lindsay ; 1983).

L'implication des Sidérophores dans l'antagonisme entre les populations microbiennes émerge de la disponibilité limitée du fer. en réponse aux conditions limitantes en fer dans la Rhizosphère, une compétition pour cet élément s'installe entre les micro-organismes (Izellalen; 1997).

Un nombre considérable d'espèces de *Rhizobium* producteurs de sidérophores est cité par la littérature scientifique.

### 5.1.3.2. Inhibition des champignons phytopathogènes par les sidérophores

**Kloepper et al., (1980)** et **Moore, (1988)** avancent que les *Rhizobium* producteurs de sidérophores, uniquement en absence de fer; imposent l'expression du phénotype d'inhibition de la croissance du micro-organisme phytopathogène visé. La synthèse de sidérophores a été utilisée comme méthode complémentaire à des techniques sérologiques pour différencier des isolats de *R. leguminosarum*.

Pour isoler les souches dont la production de sidérophores peut compter dans un antagonisme, on vérifie leur capacité à inhiber la croissance radiale de champignons phytopathogènes. L'effet bénéfique de la production des sidérophores sur les plantes est expliqué par leur synthèse (induite lors de la croissance en conditions limitantes en fer) par les *Rhizobium*. Le fer complexé au sidérophores n'est assimilable que par les micro-organismes producteurs ou possédants des récepteurs membranaires spécifiques capables de reconnaître les sidérophores (**Mortan et al., 2007**). Sachant que la flore tellurique nuisible ralentit sa croissance et sa densité dans la rhizosphère est diminuée si elle est privée du fer.

### 5.3.4. Rhizobactine des *Rhizobium*

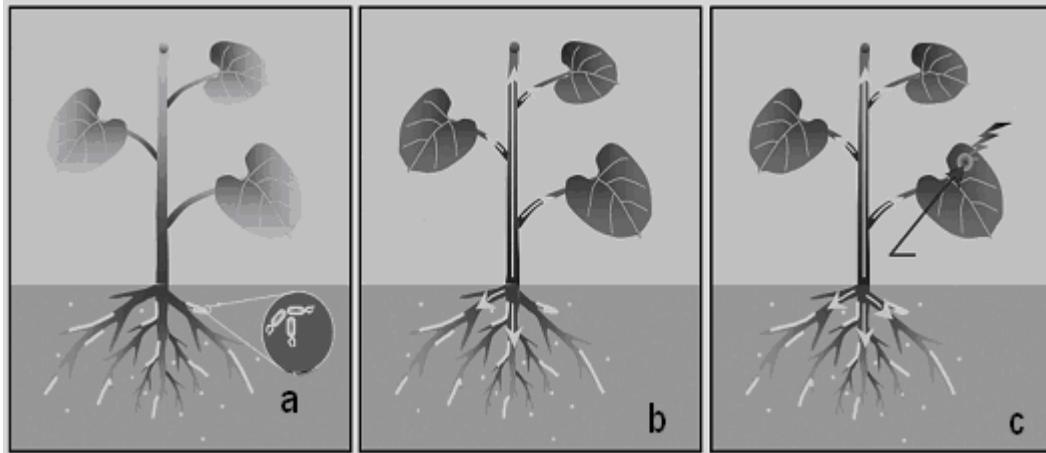
**Smith et al., (1985)** trouvent que *Rhizobium meliloti* peut produire la Rhizobactine (un acide aminopolycarboxylique avec une substitution éthylène diamine dicarboxyle et hydro carboxyle) comme groupements chélateurs. Les *Rhizobium* utilisent des acides comme des agents pour lutter contre les phytopathogènes et les ravageurs des légumineuses (**Rioux et al., 1986**). La Rhizobactine est apparentée structurellement aux opines (**Guennot, 1991**). le *R. leguminosarum* produit l'antracinate (**Guennot et al., 1990**). Alors que *B. japonicum* est capable d'utiliser l'acide citrique comme sidérophores

### 5.4. Induction de l'immunité des plantes

Devant des barrières physiques (cuticule, paroi végétale) et/ou chimiques (composés antimicrobiens). le pathogène est incapable à infecter la plante; l'interaction est dite incompatible (**Nuremberg et al., 2005**). la présence du phytopathogène peut être révélée grâce à des motifs moléculaires, après sa pénétration à travers la paroi végétale ou via une blessure (**Chisholm et al., 2006**).

Leurs perception par la plante pourra initier une réponse immunitaire, afin de limiter l'invasion (**Jones et al., 2006**). L'interaction entre la plante et le microorganisme sera compatible et suivie par une prolifération du pathogène, si les défenses mises en place sont inappropriées, si la plante ne réagit pas assez rapidement ou si les voies de défense sont désactivées. Désactivation qui s'effectue via la sécrétion par le pathogène de protéines d'avirulence, reconnues par des cultivars particuliers (**Montesano et al., 2003**). On donne le nom de Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, ou Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* : PGPR aux bactéries ayant un impact positif sur la plante, par le biais d'un effet protecteur ou via une stimulation de sa croissance (**Mercado-**

**Blanco et al., 2007**). La perception des molécules actives produites par le PGPR ou élicitation ; la transmission d'un signal systémique dans la plante et l'expression des mécanismes de défense de l'hôte, sont les trois étapes (**Fig. 10**) principales de l'ISR (**Ongena et al., 2006**).



**a** : Elicitation                      **b** : Transmission du signal      **c** : Défenses renforcées

**Fig. 10.** La résistance systémique induite chez les plantes par des *Rhizobium*.  
(**Jordan et al., 2008**)

#### 5.4.1. Les éliciteurs de l'ISR

Beaucoup de *Rhizobium* capables de stimuler l'ISR chez divers hôtes ont été isolés ; sauf que, les principes actifs responsables de l'activité biologique de ces souches n'ont été que rarement identifiés.

Dépendant en partie des lipopolysaccharides (LPS) et des flagelles présents à la surface des membranes bactériennes, la mobilité et l'adhésion racinaires des *Rhizobium*, sont des éléments importants pour une colonisation effective de l'hôte. (**Persello-Cartieaux et al., 2003**). Les quelques éliciteurs connus sont classés en trois catégories : Les composants de surface cellulaires, Les métabolites régulés par le fer et les antibiotiques **Ongena et al., (2007)**.

#### 5.4.2. Flagelline des *Rhizobium*

La flagelline (dont l'activité biologique du flagelle pourrait être due à la partie N-terminale de la Flagelline. **Gomez et al., (2002)**) d'une même souche de *Rhizobium* ne semble pas apte à stimuler l'ISR, chez la tomate et le haricot, contre des champignons, ce qui suggère des propriétés différentes selon le phytosystème étudié.

D'un autre côté, on a démontré par l'utilisation d'extraits d'enveloppes de cellules, de mutants, ou de composés purifiés, le rôle des lipopolysaccharides (L.P.S) dans l'induction de la résistance. En effet, lors de l'ISR induite par certaines souches de *R. leguminosarum*, et *R. elti* dont les L.P.S ont été testés avec des résultats positifs sur des pathosystèmes de divers phytopathogènes, tels que *Arabidopsis* : *F. oxysporum* ; haricot : *B. cinerea* ; tabac : *Phytophthora nicotianae* et pomme de terre ; cyst nématode (**VanWees et al., 1997**).

Ces L.P.S sont constitués d'un noyau oligosaccharidique, liant un groupement polysaccharidique (antigène O) à une chaîne lipidique (lipide A), intégrée dans la membrane externe des bactéries Gram négative. Dans de nombreux cas, l'utilisation de L.P.S possédant une modification de la chaîne antigénique O n'ont pas d'activité biologique, ce qui laisse à accorder un rôle à cette sous structure dans la reconnaissance par la plante (**Van Loon et al., 1998**).

Comparativement à des mutants déficients, les souches productrices d'antibiotiques, sont impliquées dans l'apparition de phénotype d'inhibition de la Croissance d'agents pathogènes. Ainsi la Pseudomycine (**Lam et al., 1987**) l'herbicoline A (**Kempff et Wolf, 1989**) et la Wianine (**Fiaishan et al., 1990**) sont des substances inhibitrices pour un bon nombre de phytopathogènes.

*Matériel*  
&  
*Méthodes*

## 1. Matériel végétal

Les graines de la fève locale (originaire de Sidi Aich) (*Vicia faba minor*), sont récupérées au niveau de l'institut national des grandes cultures de Sidi bel Abbas.

Les graines endommagées ou infectées sont écartées; les graines saines sont transférées sur des sols de régions différentes, dans le but de voir leurs capacités à pousser et à noduler.

Après floraison, les plantes de fève ont été récoltées durant la période allant du mois d'Avril 2009, récupérées au niveau 4 stations de wilaya de Tlemcen : Ghazaouet, Maghnia, Zenata, et Souahlia.

Le prélèvement des bactéries symbiotiques fixatrices de l'azote se fait à partir des nodules formés sur les racines de la fève (*Vicia faba*) pour les caractériser et les étudier sous différentes conditions.

## 2. L'isolement des souches à partir des nodules

### 2.1. Préparation des nodules

Les nodules roses (La pigmentation rose révèle la présence de la légghémoglobine), récupérés à partir des racines de la fève sont stérilisés superficiellement par immersion dans l'éthanol à 95° durant 30 secondes, puis dans une solution de chlorure mercurique  $HgCl_2$  à 0.1 % (**Fig.11**) pendant deux minutes pour éliminer le plus de bactéries possibles de la rhizosphère.



**Fig. 11.** étapes de préparation des nodules

Après des lavages consécutifs à l'eau distillée stérile, les nodules sont transférés aseptiquement dans un mortier stérile afin de les broyer.

Tout en veillant lors du prélèvement des nodosités à ne pas les arracher, une rupture de leur cortex, aurait pour conséquence une pénétration du stérilisant dans la nodosité.

### 2.2. Broyage des nodosités et ensemencement du broyat

Cinq à six nodosités sont broyées (**Fig.12**) dans 1 ml d'eau physiologique stérile, il faut bien écraser les nodules afin d'obtenir une suspension laiteuse. Une dilution de  $10^{-1}$  du broyat obtenu est réalisée, en mettant dans un tube 0,1 ml de broyat et 0,9 ml d'eau physiologique stérile.

On dépose 0.5 ml de la dilution précédente sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Y.E.M. puis on étale la goutte déposée.



Fig. 12. Broyage des nodules jusqu'à l'obtention d'un aspect laiteux

### 3. Milieu d'isolement des *Rhizobium*

Le milieu: Yeast Extract Mannitol: Y.E.M (Vincent, 1970) dont la composition(en g/l) est la suivante : Extrait de levure : 10; mannitol: 10, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>: 0,1 MgSO<sub>4</sub> : 0,2; KNO<sub>3</sub>: 0, 7; CaCl<sub>2</sub>: 0.04 Agar: 12 à 15, est utilisé pour l'isolement des souches des *Rhizobium*, c'est un milieu qui permet d'obtenir une croissance optimale de ces souches, il contient le mannitol (source de carbone préférée par les *Rhizobium*), mais il est peu sélectif car on peut avoir la croissance des autres bactéries telles que les *Bacillus*, les Actinomycètes, et même des champignons.

On ensemence par étalement une à deux gouttes de la suspension laiteuse. On laisse incuber à l'étuve à 30° C durant 3 à 5 jours, on suit l'apparition des colonies par des contrôles périodiques des boîtes.

### 4. Screening des souches

#### 4.1. Caractères cultureux

Les colonies sont observées comme décrit par Jordan (1984) à l'œil nu, pour voir leur aspect morphologique (taille, forme, leurs aspects et leurs couleurs, sur la boîte de Pétri).

#### 4.2. Caractères morphologiques

L'étude des caractères morphologiques des bactéries est réalisée par un examen microscopique, qui permet d'observer: la morphologie, taille, et le mode de groupement des bactéries.

-L'état frais : Observer la mobilité des bactéries vivantes.

-La coloration de Gram : Observation d'un frottis fixé, doublement coloré.

#### 4.3. L'effet de la croissance des souches sur le pH du milieu

Sur le milieu Y.E.M. liquide dont le pH est ajusté à 7, les souches sont ensemencées et incubées à 30° C pendant 72 heures, le pH final est déterminé.

#### 4.4. Caractères biochimiques

##### 4.4.1. Test de la catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase: enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ .

Le principe consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et de la mettre sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes. La mise en

évidence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses.

#### **4.4.2. Test de l'oxydase**

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral.

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, une colonie est déposée sur des disques imprégnés du réactif oxalate de N-diméthyle paraphénylène-diamine de couleur rose. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive.

#### **4.4.3. Le métabolisme des glucides**

Le milieu Y.E.M liquide sans mannitol est utilisé au lieu de l'eau peptonée, puisque la peptone inhibe la croissance des *Rhizobium*. Un indicateur du pH qui est le pourpre de Bromocrésol à 0,2% est ajouté à ce milieu.

7 ml du milieu et 7 gouttes de la solution glucidique à étudier sont introduites dans des tubes stériles, les souches sont ensuiteensemencées. Le métabolisme des sucres provoque une acidification du milieu qui se traduit par le virage de l'indicateur coloré vers le jaune.

### **4.5. L'étude de la croissance des *Rhizobium* sous conditions de stress**

#### **4.5.1. Le pH**

Des milieux Y.E.M solides, sont préparés avec des différentes valeurs de pH (4; 4,5; 5 et 9), coulés dans des boîtes de Pétri, puisensemencés par les souches étudiées et incubés à 30° C pendant 72 heures.

#### **4.5.2. La température**

L'évaluation de la tolérance aux fortes températures a été effectuée par l'incubation des souchesensemencées sur le Y.E.M gélosé et liquide, aux différentes températures (37° C, 47° C et 52° C) pendant 80 heures.

Les cinétiques de la croissance des souches sur le milieu liquide sont mesurées par l'évolution de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=620\text{nm}$ .

#### **4.5.3. L'effet du NaCl**

L'évaluation de la tolérance au NaCl a été effectuée par culture des souches sur le Y.E.M gélosé et liquide renfermant des teneurs croissantes de NaCl (0,3M, 0,4M, 0,6M, 0,8M, 1M, 1,19M et 1,54M), L'incubation dure 72 heures à 30° C.

Les cinétiques de la croissance sont mesurées par l'évolution de la densité optique des cultures dans le Y.E.M. liquide pour les différentes concentrations de NaCl.

### **4.6. Etude de la résistance des *Rhizobium* aux antibiotiques**

Le principe est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence des antibiotiques par diffusion à partir des disques dans un milieu gélosé. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec une concentration inhibitrice. Le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la sensibilité des souches.

#### **4.6.2. Les antibiotiques utilisés**

Chaque souche estensemencée dans 5 ml de BHIB et est incubée à 30° C pendant 72 heures.

- La D.O. de la solution bactérienne est ajustée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde  $\lambda=620$ .
  - La solution bactérienne est diluée à 1/100 puis homogénéisée par le vortex.
  - Les dilutions sont ensemencées par inondation sur boîtes coulées contenant du Muller-Hinton (voir composition en **annexe 3**).
  - après agitation, le surplus est éliminé et les boîtes sont laissées sécher.
  - Les disques d'antibiotiques sont déposés (jusqu'à 6 à 7 disques par boîte) à l'aide d'une pince stérile. (**Tab.7**)
  - Les boîtes sont incubées à 30° C pendant 24 heures.
  - Les différents diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés puis comparés avec les valeurs critiques d'inhibition donnée par le comité française de l'antibiogramme (voir **annexe 3**)
- Les bactéries sont classées dans les catégories suivantes : résistantes, intermédiaires et sensibles.

**Tab. 7.** Les antibiotiques utilisés avec charges des disques.

antibiotiques Testés	Le sigle	charge du disque
Acide naludixique	NA	30µg
Acide pipemidique	PI	20µg
Amikacine	AN	30µg
Amoxicilline	Amx	25µg
Cefotaxine	CTX	30µg
Erythromycine	E	15µg
Gentamycine	G	10µg
Kanamycine	K	30µg
Lincomycine	L	15µg
Oxacilline	OX	5µg
Pénicilline	P	6µg
Streptomycine	S	10UI
Tétracycline	TE	30µg
Vancomycine	VA	30µg

## **5. Test d'antagonisme (*Rhizobium*-champignon)**

### **5.1. Les Champignons**

Les champignons testés sont:

*Penicillium sp.* (BT2) (Prélevé sur l'orge).

*Aspergillus niger* (BDB5) (prélevé sur un blé dur broyé).

*Fusarium oxysporum* (F16).

*Rhizopus stolonifère* (O1).

*Aspergillus flavus* (O2).

*Alternaria* (O11).

*Trichoderma* (R).

Ces souches proviennent de la collection du laboratoire des substances naturelles- département de biologie- université de Tlemcen. Ces champignons ont été choisis car, ils sont des phytopathogènes et sont capables de pousser en carence de fer.

L'activité antifongique de chacune des 20 souches de *Rhizobium* a été testée contre chacun des champignons cités.

## **5.2. Tests de compétition**

Réalisés comme décrit par (Buyer et al., 1989), sur le milieu Y.E.M solide. Ce milieu mime relativement la composition minérale et organique de la rhizosphère, ce qui permet l'évaluation des capacités compétitives des souches de *Rhizobium*, envers les champignons phytopathogènes utilisés dans ce travail.

### **5.2.1. Test préliminaire**

La souche de *Rhizobium* estensemencée au centre de la surface du milieu solide YEM, alors que la souche de champignon estensemencée par étalement autour de la souche de *Rhizobium*. -il est possible aussi de voir l'action d'une souche de *Rhizobium* sur 04 genre de champignons qui sontensemencés a distances égales d'une souche de *Rhizobium*ensemencée au centre de la surface du milieu solide YEM sur une même boîte de Pétri

### **5.2.2. Test par strie**

On a fait un ensemencement de la souche de *Rhizobium* par strie, puis on ajoute un inoculum fongique dans la périphérie de la boîte. Chacune des 20 souches est testée contre chacun des champignons

### **5.2.3. Test d'étalement le *Rhizobium***

On étale la souche de *Rhizobium* sur milieu Y.E.M dans une boîte de Pétri, après 1-2 heures, onensemence par touche 04 genres de champignons. Chacune des 20 souches est testée contre les champignons étudiés

### **4.2.4. Etalement de champignons**

Le champignon est mis en culture sur des milieux Y.E.M solide sans inoculum de *Rhizobium*. Après 4 jours de croissance à température 28°C, Au milieu de chaque boîte, on dépose un inoculum bactérien de *Rhizobium*. Chacune des 20 souches est testée contre chacun des champignons

## **6. Test d'antagonisme (filtrat de *Rhizobium*-champignon)**

Ce test est réalisé pour affiner et confirmer ou infirmer les résultats du précédent, deux méthodes sont couramment utilisés: la méthode des puits et la méthode des disques.

### **6. 1. Méthode des puits**

#### **6.1. 1.Tests préliminaires**

##### **6.1.1.1. Test sans filtration de la suspension**

Chacune des 20 souches de *Rhizobium* est cultivée sur milieu Y.E.M liquide, puis incubée à 30°C pendant 24 h. chacune des 20 suspensions est centrifugée à 6000 tours pendant 10 minutes, le filtrat est récupéré afin de le tester contre les champignons Y.E.M solide. Sur une boîte de Pétri contenant un puits central, remplit par le filtrat de *Rhizobium*. Après 1 heure, on aensemencé les champignons (on peut tester 04 champignons à la fois) par touche, autour de puits et on a incubé à 28°C pour lire après 72 h.

### **6.1.1.2. Test avec filtration de la suspension sur papier Watt man**

La suspension est centrifugée à 7000 tours pendant 15 min( on c'set aperçu que 6000/10mn est insuffisante), puis filtrée à travers un papier Wattman stérilisé, la suspension de champignons est étalée autour du puits. Après 2 h, on a rempli ce puits avec le filtrat récupéré. On a incubé à 28 °C pour lire après 48 h.

### **6.1.2. Test avec filtration de la suspension sous vide (test proprement dit)**

La suspension est traitée selon la méthode décrite par (El-Batanony et *al.*, 2007): une centrifugation à 7000 tours pendant 20 minutes, ensuite chaque surnageant est filtré à travers un millipore (0.45 µm). Les filtrats sont testés pour leur activité antifongique. Après 2 h, on aensemencé les champignons par étalement autour d'un puits central, on incube à 28 °C pendant 48 h.

### **6.2. Estimation d'inhibition**

L'apparition d'une zone claire signifie l'inhibition des champignons par les *Rhizobium* et qui peut être mesurée par un diamètre (mm) d'inhibition.

### **6.3. Méthode de disques**

Pour assurer l'élimination totale des *Rhizobium* dans le filtrat, on a congelé les filtrats à -15°C pendant 24 h puis on a décongelé à la température ambiante, et on a utilisé des disques en papier Watt man stérilisé. Les champignonsensemencés par étalement sur les boites, après 2 h d'incubation on a déposé les disques imbibés par les filtrats de *Rhizobium* puis met ces boites à 4°C (1-2 heures) pour assurer une meilleure diffusion des filtrats. Puis on incube à 28°C pour lire après 48-72heures.

## **7. Effet des composés phénoliques sur la croissance des *Rhizobium***

On a testé l'effet de chaque composé phénolique sur chacune des souches sur YEM solide et sur Y.E.M. Liquide.

Aimablement fournis par le laboratoire des substances naturelles. Université de Tlemcen, les composés phénoliques utilisés sont:

La naringine ; l'acide p-coumarique ; le phloroglucinol; le pyrocathécol, l'hydroquinone et le résorcinol.

### **7.1. Préparation l'inoculum de *rhizobium*.**

Un litre de Y.E.M liquide est préparé qui sera réparti sur 20 flacons, à raison de 50 ml de Y.E.M par flacon, dans chaque flacon, un inoculum d'une des 20 souches de *Rhizobium* sera introduit, les suspensions seront incubées à 30 °C pendant quatre jours.

#### **7.1.1.1. Première méthode**

Dans chaque tube à essai on mélange 10 ml de milieu YEM gélosé en surfusion et 0.2ml (2%) de l'inoculum précédemment préparé. Ce mélange est versé dans des boites de Pétri, après être refroidi, des disques y sont déposés (4 disques dans chaque boite) à l'aide d'une pince stérilisée.

Sur chaque disque on ajoute une concentration de 4 µl de composé phénolique (Prélevée d'une solution mère: 4mg/ml de méthanol, puis on incube les boites de Pétri à 4° pendant une nuit, ensuite dans l'étuve à 30°C durant 3 à 4 jours, on suit le comportement des souches étudiées

### **7.1.1.2. Deuxième méthode**

On dépose 0.2 ml de l'inoculum sur la surface Y.E.M solide, puis on étale la quantité déposée avec un râteau. Puis on dépose un disque qui sera imbibé par des gouttes du composé phénolique à tester. Les cultures sont réfrigérées à 4°C pendant une nuit, puis incubées à 30°C durant 3 à 4 jours

### **7.2.1. Test sur milieu liquide**

Dans chaque tube à essai on introduit 20 ml de Y.E.M liquide puis on ajoute 500 µl de Y.E.M. contenant le *Rhizobium* puis on mélange. Une fois la densité optique est entre 0.045 et 0.055, le contenu est réparti également dans deux tubes (un vas servir de témoin). On verse environ 10 ml de ce mélange dans un deuxième tube et on additionne 4 µl du composé phénolique étudié. Les deux tubes seront réincubés à la même température, pour lire la densité optique de la solution bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm à trois temps ( $t_0=0h$  ;  $t_1=6h$  et  $t_2= 24 h$ ) dans les deux cas de l'expérimentation.

### **7.3. Test par des disques imbibés par le composé phénolique**

Le principe est basé sur l'observation de l'activation ou de l'inhibition de la croissance bactérienne en présence des disques imbibés d'un composé phénolique, inspiré de la méthode de diffusion préconisée par **Kirby et al. (1966)** est qui se diffuse dans un milieu YEM gélosé. Des disques de 1cm de diamètre sont imprégnés dans une solution du composé phénolique à tester puis sont déposés sur YEM solide ont incubé à 30 °C .et la lecture se fait après 24 heures

### **7.3. Traitement statistique.**

Les résultats donnant l'évolution (par densité optique) de la croissance de chacune des souches avec ou sans addition du composé phénolique, sont statistiquement analysés par l'utilisation d'un ANOVA2 à 2 facteurs, pour chaque souche. Le test ANOVA2 est associé à un test de comparaison de Tukey.

*Résultats  
et  
Discussions*

## 1<sup>ère</sup> partie

### 1. Infectivité et efficacité

Les graines de la fève qui sont cultivées dans le sol (régions d'étude) ont donné après deux mois, une efficacité assez importante, ceci est dû certainement à la présence des souches infectives de *Rhizobium*. Les régions choisies sont connues par leurs productions de quantités importantes de fèves. Les sols de ces régions sont très favorables à cette symbiose.

La **figure 13** montre le nombre important des nodules sur la racine principale et les racines secondaires. Le développement et la qualité du système racinaire de la fève impliquent une interaction entre la plante, les organismes symbiotiques et les facteurs de l'environnement

L'infection d'une légumineuse par son *Rhizobium* spécifique sera favorisée, si les bactéries se trouvent dans le sol à une concentration suffisante.

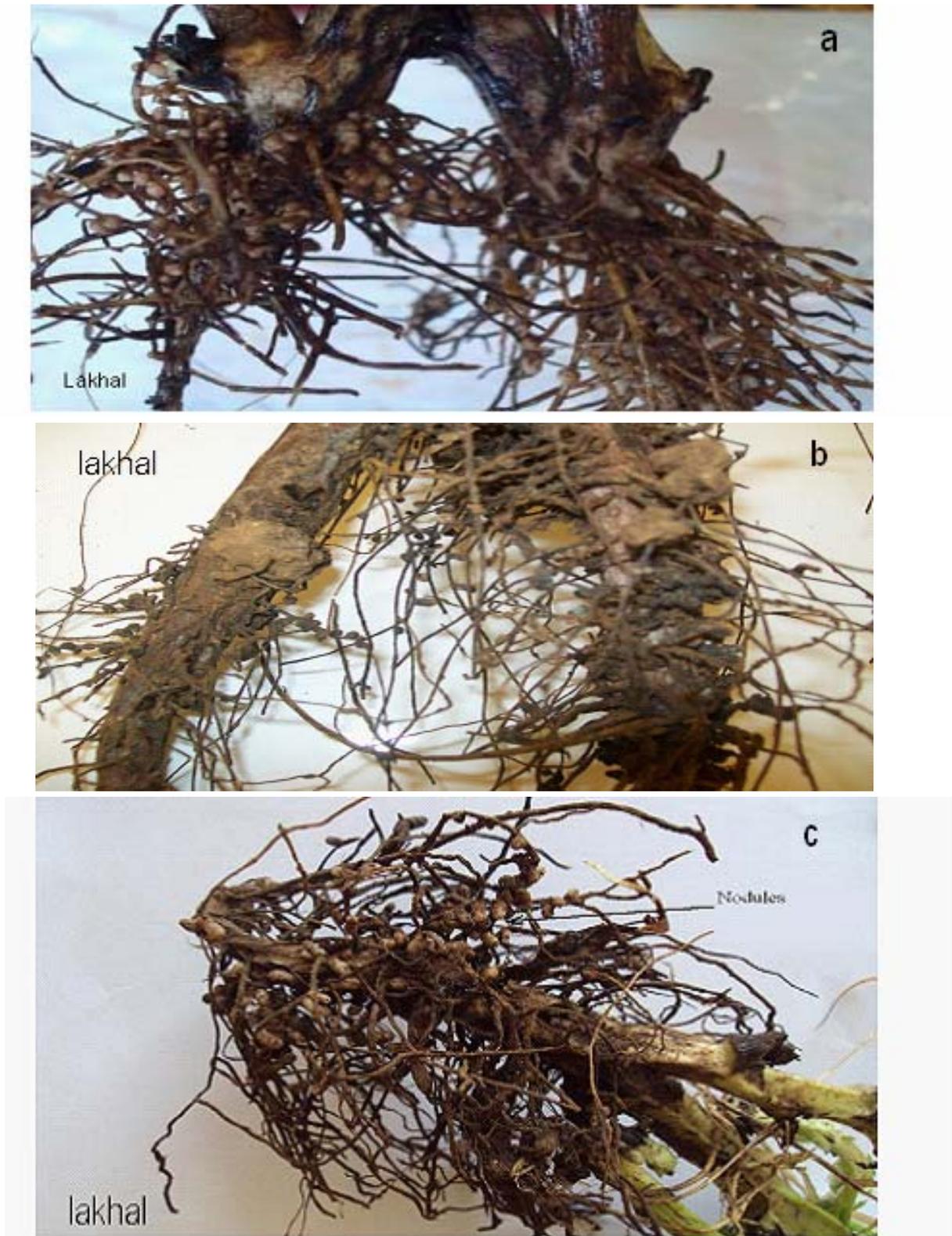
De nombreux articles de synthèse, rendent compte des différents facteurs biotiques (toxines végétales ou microbiennes, parasites, prédateurs...) et abiotiques (facteurs physico-chimiques : acidité, salinité...) interfèrent avec la survie des *Rhizobium*. Les principaux sont:

La salinité et la sécheresse: constituent des contraintes majeures, limitant considérablement la productivité végétale sur 40% de la surface terrestre, notamment en régions méditerranéennes (FAO, **1988**).

La température: la formation des nodules fixateurs d'azote est sensible aux fortes températures (**Abaidoo et al., 1990**).

Le pH: l'acidité des sols, comme ceux riches en aluminium, affecte la formation nodulaire (**Wolff et al., 1993**), elle est plus active sur les sols neutres, ou légèrement acides. Ces facteurs ont des effets délétères sur la croissance et la survie des populations rhizobiennes, sur l'initiation et le fonctionnement nodulaire (**Zahran et Sprent, 1986**).

Les dimensions des nodules varient d'une plante à une autre, à mais la plus part sont de couleur rose à rose blanches d'autres sont blanches, mais avec des formes généralement allongées et rarement bombées.



**Fig.13. Nodosités sur les racines de la fève cultivées dans les régions de:  
a: Maghnia; b: Zenata et c: Souahlia**

Le **tableau 8** présente le nombre des nodules sur les racines (principales et secondaires) des plantes des 4 échantillons. Ce nombre oscille (valeur moyenne) entre 90 et 145. Généralement, plus de 100 nodules par racine de légumineuse sont comptés; on parle de supernodulation.

**Tab. 8.** Les caractéristiques des racines et des nodules des plantes des 4 régions.

Régions	L moy.	L. moy.	nombre	forme	couleur	taille
Maghnia	24	10,8	95	allongée	rose	0.3-0.5
Zenata	19	11	106	Allongée	rose	0.2-0.4
Ghazaouet	15	9,4	89	Allongée	rose	0.3-0.5
Souahlia	17	7	63	Déformée	Blanche-rose	0.30.4

## 2. Résultats de l'isolement de bactéries à partir des nodules

Des colonies bactériennes rappelant les *Rhizobiums* sont obtenues. Après ensemencement d'une à 2 gouttes (pipette Pasteur) du broyat des nodules, sur YEM, (72 heures d'incubation à 30° C)

Vu la diversité des microorganismes observés on a procédé à des purifications par passages successifs sur milieux solides et liquides pour enfin purifier les souches de *rhizobium*. On a choisis les isolats du genre *Rhizobium* en se basant sur :

- 1-Le temps d'incubation (72 heures).
  - 2-forme des colonies (colonies muqueuses, bombées, circulaires et Brillantes aspect mielleux) voir **Tab.9** qui récapitule ces morphologies
  3. La température pour une croissance optimale de la croissance est de 28°C
  4. Le pH Pour une croissance optimale est de 7,00
  - 5-La mobilité et la coloration de Gram (Gram négative). **Fig. 15**
- En plus, l'identification a été effectuée en utilisant d'autres tests:

**Tab. 9.** morphologies des colonies des souches de *Rhizobium*

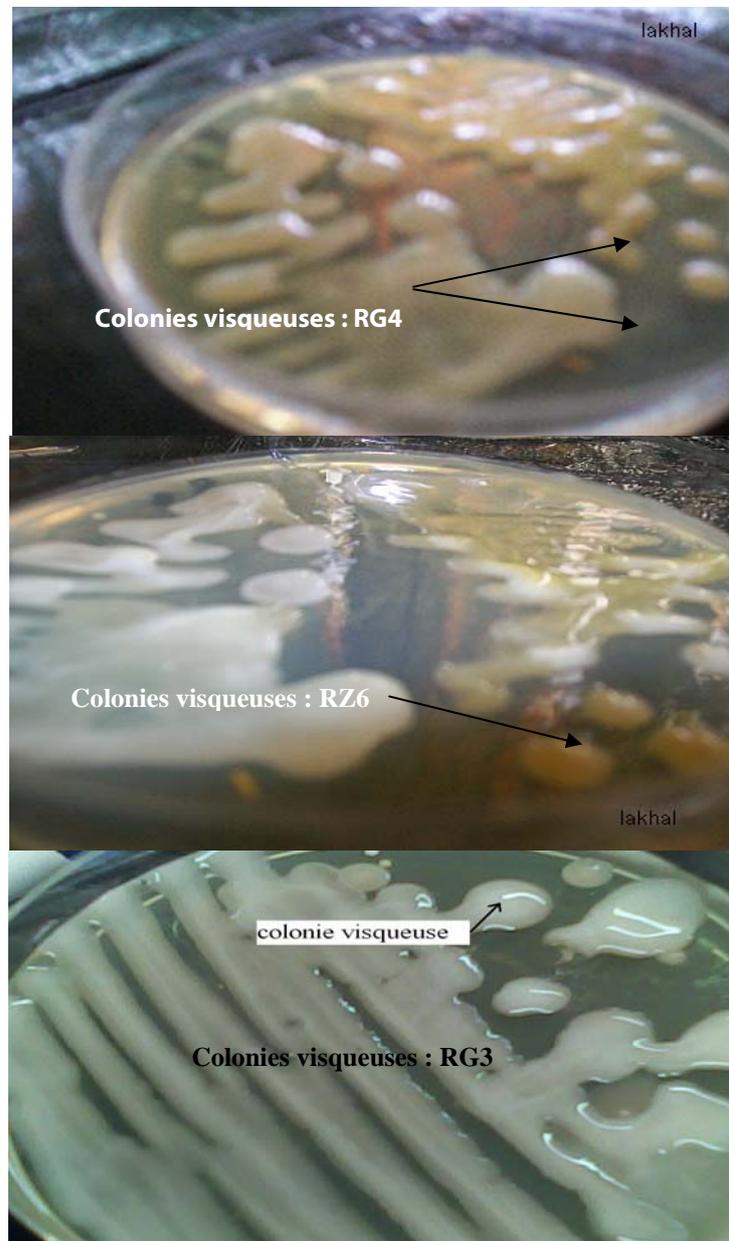
Souches	Aspect et couleur des colonies
RZ <sub>1</sub> , RZ <sub>4</sub>	envahissantes, visqueuses et bombées, couleur mielleuse et brillante
RM <sub>4</sub> , RM <sub>1</sub>	envahissantes et visqueuses, couleur jaune
RG <sub>3</sub> , RM <sub>3</sub>	Circulaires, visqueuses, couleur mielleuse brillante, 7 à 8 mm de diamètre
RZ <sub>6</sub> , RZ <sub>4</sub> , RG <sub>4</sub>	circulaires, très visqueuses, beige brillante à marron; diamètre de 6-7 mm
RM <sub>5</sub> ,	circulaires, peu visqueuses, de couleur jaune et un diamètre de 7 mm
RS <sub>1</sub> , RS <sub>2</sub> , RS <sub>3</sub> . RS <sub>4</sub>	circulaires, visqueuses et bombées, couleur beige et un diamètre de 6 mm
RM <sub>2</sub> , RM <sub>6</sub>	circulaires et visqueuses, marron clair avec un diamètre de 5 à 6mm
RZ <sub>3</sub> , RG <sub>2</sub>	Grandes circulaires et visqueuses
RG <sub>1</sub> , RZ <sub>2</sub>	Moyennes irrégulières, beiges non muqueuses

### 1.3. Production de polysaccharides

Presque la totalité des colonies de *Rhizobium* sont visqueuses (**Fig. 14**) avec un aspect mielleux signe de la production de polysaccharides; les colonies (muqueuses, bombées et de couleur beige) des souches RZ6 et RG4 sont deux exemples.

## Résultats et discussions

**Scheidle et al. (2005)**, a trouvé que la coloration des colonies en jaune, est caractéristique de ces composés en partie lipidiques. Sur un gel de polyacrylate, les R-LPS, de petites tailles, migrent le plus rapidement que les S-LPS. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote réside dans l'inhibition des réactions de défenses de la plante dans les étapes plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisées, en empêchant la mise en place du choc oxydant

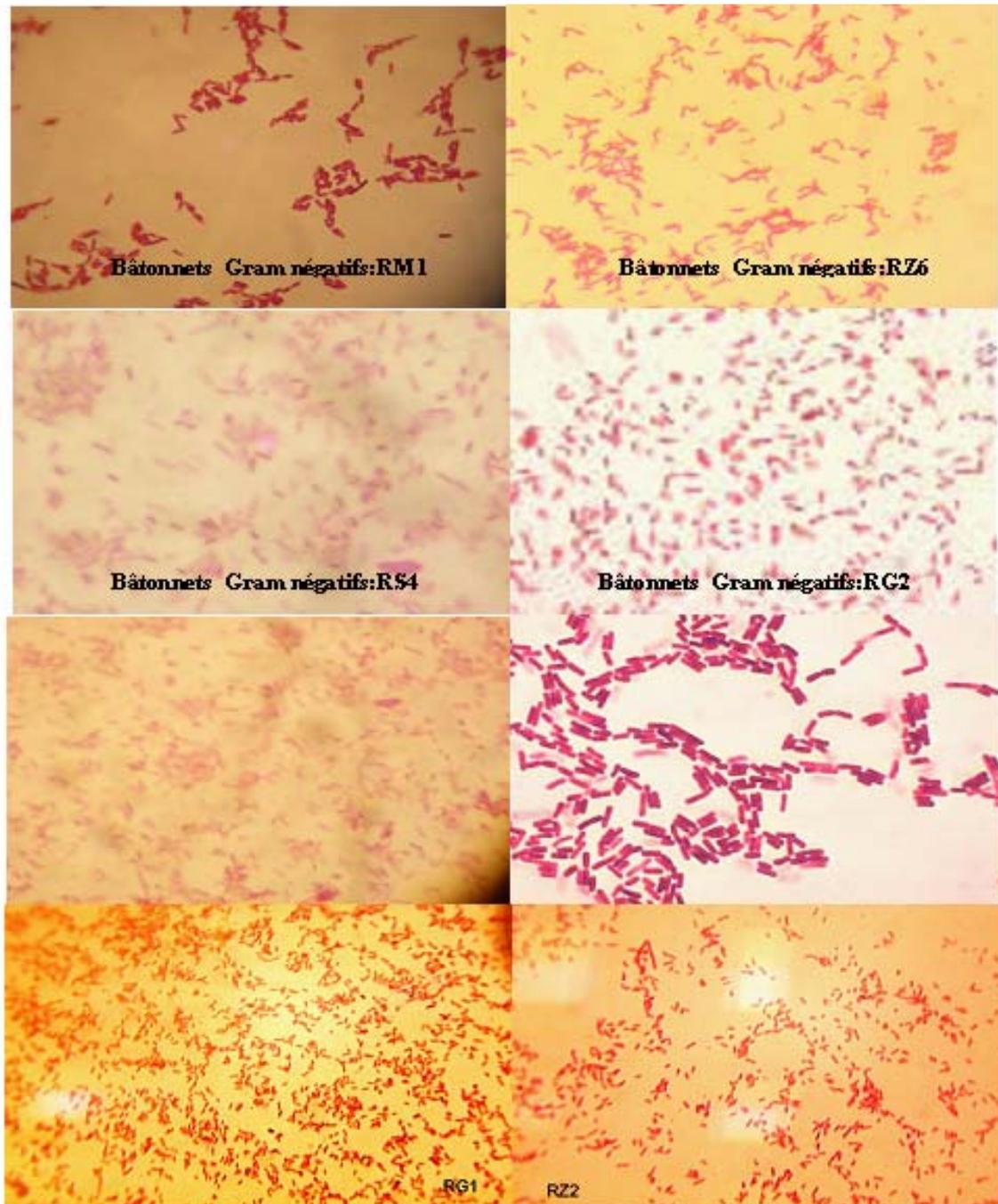


**Fig.14.** production de polysaccharides par les *Rhizobium*: RZ6, RG4, RG4

Selon **Rosenberger et al (2004)** les lipopolysaccharides(LPS) des *Rhizobium* sont d'importants facteurs de virulence, permettant de surmonter les mécanismes de défense du pathogène, ils jouent un rôle important dans la suppression des champignons qui est accompagnée d'une perte intracellulaire de survie qui réduit ainsi

## Résultats et discussions

fortement la virulence des souches. **Abramovitz et al., (2004)**, montrent que dans le cas des *Rhizobium*, Les LPS se distinguent comme substance antifongique, alors que **Chakraborty et Chakraborty, (2006)** ont constaté que le *Verticillium albo-atrum* et le *F. oxysporum* ont été inhibés respectivement par 7, 6 et 7,8% des isolats de *Rhizobium* grâce à leurs productions de polysaccharides. Une production d'amylases par des souches indigènes (brésil) à partir de différents substrats carbonés a été rapportée par de Oliveira et al., (2007)



**Fig.15.** Exemples de *Rhizobiums* (bâtonnets Gram négatif); observation "x100 " au microscope optique, Zeiss

## 2. L'influence des souches étudiées sur le pH du milieu

Les résultats d'acidification des milieux obtenus après incubation à 30 ° C pendant 72 heures des isolats choisis sont donnés dans le **Tab.10**

**Tab. 10.** Résultats du pH final des 20 souches du milieu d'ensemencement.

Souches	pH initial	pH final
RM <sub>2</sub> , RZ <sub>5</sub> , RZ <sub>6</sub>	7,00	5,66
RG <sub>2</sub> , RZ <sub>3</sub> , RS <sub>1</sub> , RM <sub>3</sub>	7,00	5,61
RS <sub>4</sub> , RM <sub>5</sub> , RM <sub>1</sub> , RZ <sub>2</sub>	7,00	5,78
RS <sub>3</sub> , RM <sub>4</sub> , RG <sub>3</sub> , RZ <sub>1</sub> , RZ <sub>4</sub>	7,00	5,45
RG <sub>1</sub> , RS <sub>2</sub> , RG <sub>4</sub> , RM <sub>6</sub>	7,00	5,49

Il ressort de ce tableau que les souches ont un pouvoir d'acidification du milieu, chose qui est en accord avec **Norris (1965)** qui a classé les *Rhizobium* en deux groupes selon leur capacité à acidifier ou alcaliniser le milieu et qu'il a constaté que les souches à croissance rapide, qui forment des colonies bien développées après 3 à 5 jour sur le milieu solide ont un pouvoir acidifiant. Il est clair aussi que ces souches acidifient leur milieu d'une façon presque identique ce qui laisse à penser qu'elles sont d'espèces trop voisines.

## 3. Caractères biochimiques

Il faut noter que l'ensemble des souches étudiées catalase et oxydase positives; les *Rhizobium* sont des bactéries aérobies.

### 3.1. Le métabolisme des glucides

Ce test est réalisé dans le but de voir la source carbonée préférée par les différentes souches étudiées, il l'une des bases de l'identification biochimique. Les résultats sont récapitulés dans le **Tab. 11**.

**Tab.11.** Résultats du métabolisme des glucides par les isolats de *rhizobium*

Souches	Glu	Fru	Ara	Mal	Xyl	Man	Lac	Sor	Sac	Ami
RM <sub>3</sub> , RM <sub>1</sub> , RM <sub>2</sub> , RG <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RG <sub>3</sub> , RM <sub>4</sub> , RM <sub>5</sub> , RM <sub>6</sub> , RG <sub>1</sub> , RG <sub>4</sub>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
RZ <sub>3</sub> , RZ <sub>1</sub> , RZ <sub>4</sub> , RZ <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
RZ <sub>5</sub> , RS <sub>3</sub> , RS <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RS <sub>4</sub> , RS <sub>1</sub> , RZ <sub>2</sub>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+

Le tableau montre que:

- les souches utilisent différemment les sucres
- Toutes les souches dégradent préférentiellement et rapidement le mannitol (polyol), le xylose, le fructose et le saccharose (disaccharides).
- Le maltose (disaccharide) et l'amidon (polysaccharide) sont dégradés par toutes les souches à l'exception de la souche **RG<sub>3</sub>, RM<sub>4</sub>, RM<sub>5</sub>, RM<sub>6</sub>, RG<sub>1</sub> et RG<sub>4</sub>**,

- Le glucose (monosaccharide) est dégradé par toutes les souches sauf **RM<sub>3</sub>**, **RM<sub>1</sub>**, **RM<sub>2</sub>**, et **RG<sub>2</sub>**
- Le lactose (disaccharide) est dégradé par la moitié du nombre des souches
- Le sorbitol (polyol) est dégradé par les souches: **RZ<sub>5</sub>**, **RS<sub>3</sub>**, **RS<sub>2</sub>**, **RM<sub>3</sub>**, **RM<sub>1</sub>**, **RM<sub>2</sub>**, **RG<sub>2</sub>**

Un nombre important de travaux s'est penché sur ce métabolisme on peut citer Les travaux de **Allen et Allen (1950)** qui ont constaté que tous les *Rhizobium* à croissance rapide utilisent facilement les mono et les disaccharides et de manière restreinte les tri et les sucres contenant des fonctions alcools, de même **Graham (1964 a/b)** a montré que toutes les souches de *Rhizobium* sont capables de se développer sur des composés représentant des tri et disaccharides, des aldoses et polyalcools. **Chakrabarti et al. (1981)** précisent que chez *Rhizobium meliloti* le classement suivant peut être établi en fonction de la rapidité de la croissance : mannitol, glucose, puis gluconate alors pour *Rhizobium léguminosarum* bv. *trifoli* l'ordre est : mannitol, glucose, arabinose puis le gluconate.

#### 4. Tolérance aux différents facteurs

##### 4.1. Le pH

La mise en culture des souches choisies sur le Y.E.M gélosé avec les différentes valeurs de pH (**4- 4,5- 5- 9**) montre que :

Toutes les souches n'ont pas poussé sur le Y.E.M à **pH 4- 4,5 et 5** à l'exception de la souche **RZ<sub>4</sub>** qui a poussé à un **pH 5 ( Fig.16)**, dans ce sens **Graham et Parker (1964)** ont trouvé que les *Bradyrhizobium sp.* isolés à partir de lupin ont une croissance optimale à des **pH** acides que les autres espèces *Bradyrhizobiales*. **Chen et al. (1993)** ont étudié la tolérance du *Rhizobium léguminosarum ANU1173* au pH acide et ils ont trouvé que cette souche a pu pousser sur un pH de **4,5**, également **Tiwari et al. (1998)** affirment que le *Rhizobium meliloti* WSM419 est capable de croître à pH 5,7.

Plus encore **Raza et al. (2001)** ont montré que les souches de *Rhizobium* isolées des nodules *Lupinus albus* de l'Egypte tolèrent des **pH extrêmes** dont l'intervalle allant de **4 à 10**.

Selon **Maàtallah et al. (2001)** l'analyse de cinquante six souches de *Rhizobium* nodulant deux cultivars de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et isolées de différentes régions de Maroc, montre que certaines d'entre elles sont capables de pousser à un pH allant de **5 à 8**. Dans le même contexte **Maria José et al. (2004)** ont trouvé que le *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium sp.* sont capables de noduler l'*Alfalfa* à un pH de **5,6**. Alors que sur cinq souches de *Rhizobium sp.* de la région de Tlemcen, **Lakhal et al., (2008)** ont remarqué que les cinq souches poussent à pH 9.



**Fig.16.** Exemples de croissance de R<sub>2</sub> à pH 9 et 5 et de 05 autres souches à pH 9.

#### **4.2. La température**

Après incubation aux différentes températures des souchesensemencées sur Y.E.M gélosé, toutes les souches ont poussé à **37° C**. Aucune souche n'a poussé à **47** et **52° C**. Ce qui signifie que ces souches ne tolèrent pas les fortes températures.

Des exemples de courbes (**Fig. 17**) représentent la croissance sur Y.E.M liquide, à différentes températures en fonction du temps, des souches choisies (une souche de chaque région d'étude)). Elles montrent que la croissance de toutes les souches dans les températures élevées (**47° C et 52° C**) est négligeable, ce qui signifie que ces souches ne tolèrent pas les fortes températures. Ces résultats reproduisent ceux obtenus sur milieu solide.

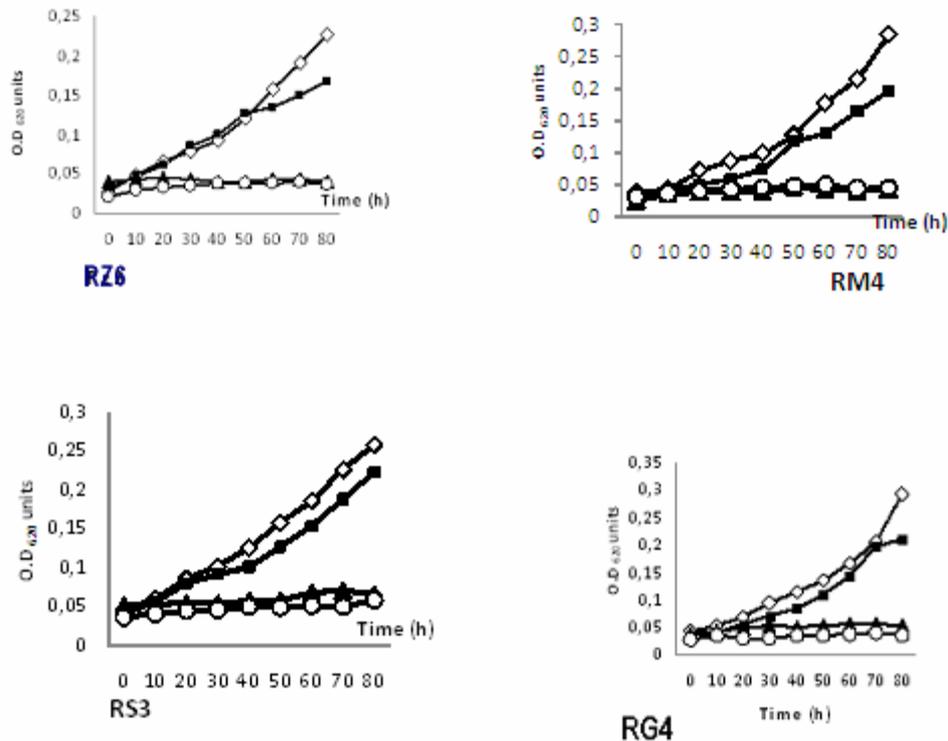


Fig.17. Cinétique de la croissance de à différentes températures.

Rz<sub>6</sub>, RM<sub>4</sub>, Rs<sub>3</sub> et RG<sub>4</sub>

30° C ◊ 37° C ◆ 47° C ▲ 52° ○

**Bowen et Kennedy (1959)** ont constaté que plusieurs *Rhizobium* sont capables de pousser à 40°C. **Wilkins (1967)** a trouvé que les bactéries nodulant *Medicago* survivent **32 heures à 60°C** dans les sols secs, mais elles ne peuvent pas survivent **5 heures à 55°C** dans les sols humides; alors que **Iswaran et al. (1970)** ont observé la mort rapide de *Bradyrhizobium japonicum* dans un sol à température de 40°C.

Dans ce même contexte **Chatel et Parker (1973)** ont trouvé que la nodulation est réduite quand les sols contenant *Rhizobium trifolii*, sont maintenus à une température de **60°C** pendant 6 heures. Les souches sénégalaises supportent des températures de **45°C**.

Une tolérance entre **44°C et 47°C** à été observé chez certaines souches isolées au Kenya (**Destremaux, 1974**) et au soudan (**Bellfontaine, 1979**). Des souches de *Rhizobium meliloti* isolées des sols d'*Acacia* de différentes régions sénégalaises et tunisiennes ont été étudiées (**Pontarier, 1995**) pour leur tolérance à des températures élevées allant de **44°C à 42,5°C**.

**Abdelgadir et Alexander (1997)** ont montré que le *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* peut survivre à **45°C**. Alors que **Maatallah et al. (2001)** confirment que cinquante six souches de *Rhizobium* nodulant deux cultivars de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) poussent optimalement entre **30 à 35°C**.

**Vriezen et al., (2007)** rapportent une relation de la pression osmotique, la température et l'oxygène à la résistance des souches de *Rhizobium* à l'aridité, ce qui donne l'opportunité aux chercheurs de collectionner des souches résistantes au stress hydrique.

Bien sûr d'autres études sont menées, dans le sens contraire, c'est le cas par exemple de *Rhizobium meliloti* qui montre une capacité à réaliser la symbiose même à des températures oscillant entre 9-12° C seulement (**Wendell et al., 1995**)

### 4.3. Tolérance au NaCl

La mise en culture des souches étudiées sur le Y.E.M gélosé enrichi en concentrations croissantes de NaCl montre que:

- Toutes les souches peuvent croître sur le milieu contenant **0,3 et 0,6 M** de NaCl.
- La majorité des souches tolèrent la concentration saline de 0,8M
- A partir de **1M** la croissance de ces souches est inhibée.

Les courbes de la **figure 18** représentent la croissance des souches choisies sur Y.E.M liquide, à différentes concentrations de NaCl en fonction du temps. Ces courbes montrent que les concentrations de **1M, 1,19M et 1,54M** sont inhibitrices à la croissance de toutes les souches, alors que la concentration de **0,8M** inhibe seulement une souche. Ce qui est compatible avec les résultats obtenus sur Y.E.M gélosé.

**Khatteli (1994)** a constaté que la tolérance aux concentrations de NaCl supérieures à **1,5% (15g /L, 0,25M)** est **rare** chez certains *Rhizobium*. Il a fait une étude comparative entre des souches provenant des sols sénégalais et des sols tunisiens concernant la tolérance à des concentrations de NaCl de **1% (10g /L, 0,17M) et 2% (20g /L, 0,34M)**. Les isolats prévenants du Sénégal sont capables de croître en présence de **2%** de NaCl par contre les isolats tunisiens n'ont pas pu pousser à cette concentration, seulement quelques souches ont montré une faible tolérance à 1% de NaCl.

**Moez et al. (2000)** ont analysé la tolérance au NaCl des souches de *Sinorhizobium* isolées de *Medicago sativa* sur Y.E.M. solide et liquide. Sur le milieu solide cette analyse a permis de sélectionner trois grands groupes d'isolats:

- des isolats sensibles ne tolérant pas des concentrations supérieures à 0,15 M (7,8 g/L)
- des isolats tolérants des concentrations supérieures à 0,7 M (40 g/L).
- des isolats tolérants des concentrations supérieures ou égales à 0,5 M (29,25 g/L) (tolérance intermédiaires).

Sur milieu liquide, ils ont pris un échantillon de 12 isolats (4 tolérants, 4 sensibles et 4 intermédiaires) pour réaliser une étude de la cinétique de la croissance à des concentrations de NaCl de 0,15M (8,7g /L), 0,3M (17,55g/L), 0,5M (29,25g/L) et 0,7M (40g/L). Les résultats montrent que les souches tolérantes croissent plus rapidement et les sensibles plus lentement.

D'une autre part, sur 56 souches de *Rhizobium* nodulant deux cultivars de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Certaines d'entre elles sont capables de pousser aux

## Résultats et discussions

concentrations de 1% (10g/L, 0,17M) à 1,5% (15g/L, 0,25M) (Maatallah et al. 2001). Alors que, Raza et al. (2001) ont trouvé que toutes les souches de *Rhizobium* isolées à partir de lupin (*Lupinus albus*) de l’Egypte sont capables de résister à 5% de NaCl (50g/L, 0,85M) tandis que ces mêmes souches ne poussent pas à 8% (80g/L, 1,36M). Benkhaled et al. (2000) ont constaté que l’application du stress salin dans un milieu hydroponique à des plantules de trèfle (*Trifolium alexandrenum* L.) Inoculées par les *Rhizobium* sp. affecte la nodulation à partir de (0,03M) de NaCl. L’osmorégulation chez les *rhizobiums* est très recherchée vu son importance en agriculture, une bactérie osmorégulatrice combat la sécheresse en gardant une haute pression intracellulaire (Le Rudulier, 2007)

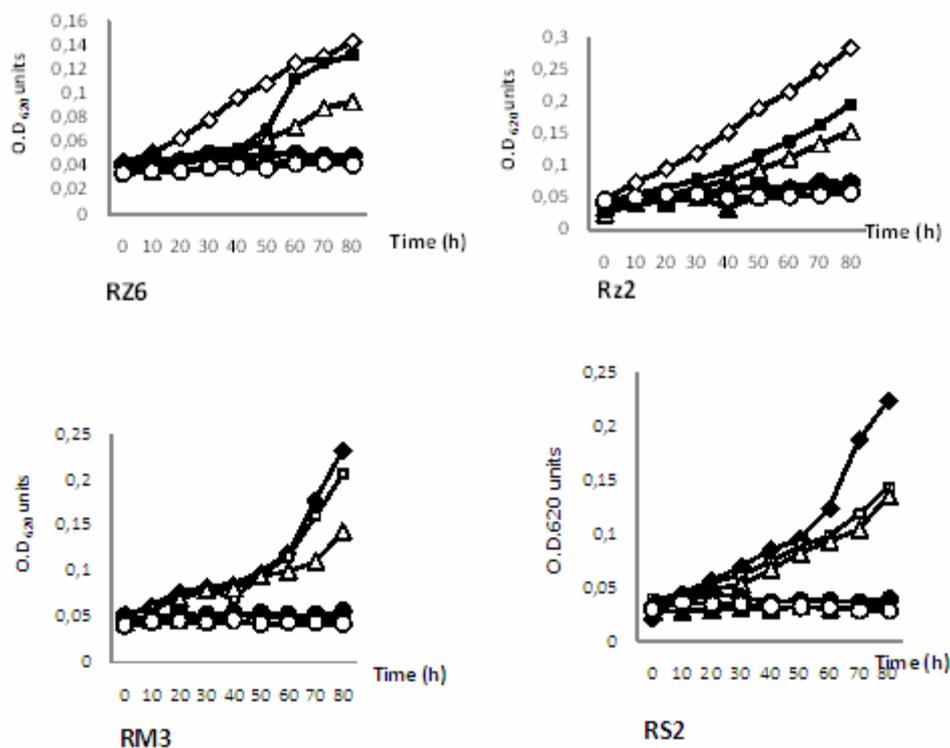


Fig. 18. Cinétique de la croissance à différentes concentrations de NaCl.

◆ 0,3 M    ◇ 0,6 M    △ 0,8 M    ● 1 M    ▲ 1,19 M    ○ 1,5 M

2<sup>ème</sup> Partie

L'antibiorésistance intrinsèque

1-Distribution de l'antibiorésistance

Le **tableau. 12** donne le profil de la résistance des souches de *Rhizobium* à 14 Antibiotiques, il révèle une variabilité de la résistance des souches vis-à-vis aux antibiotiques testés.

**Tab.12. Distribution des souches selon les régions et selon les résistances**

Nombre	Antibiotiques	zones			
		G	M	S	Z
05	CTX, AMX, P, OX, NA	RG1	RM5		RZ1, RZ2, RZ3,
	CTX, AMX, P, OX, NA, S		RM1	RS2	
06	CTX, AMX, P, OX, NA, E	RG3			
	CTX, AMX, P, OX, S, VA	RG2	RM6		
07	CTX, AMX, P, OX, NA, PI, TE				RZ6
	CTX, AMX, P, OX, NA, PI, E			RS4	
	CTX, AMX, P, OX, NA, TE, E		RM3	RS3	
	CTX, AMX, P, OX, NA, S, E		RM2		
	CTX, AMX, P, OX, NA, S, PI			RS1	
08	CTX, AMX, P, OX, NA, S, TE				RZ4
08	CTX, AMX, P, OX, AN, PI, E, VA				RZ5
10	CTX, AMX, P, OX, PI, S, TE, E, VA, AN		RM4		

-Toutes les souches sont résistantes à l'Amoxicilline, Cefotaxime, Oxacilline et Pénicilline (Les *bétalactamines*) et toutes sont sensibles à la Gentamycine et la Kanamycine.

-Pour l'Acide naludixique, RG2, RM6, RZ5 RM4 sont sensibles, les autres sont résistantes.

-Pour la Vancomycine, les souches RG2 et RM6, RZ5, RM4 sont résistantes alors que, les souches RZ4, RM2 et RS3 sont intermédiaires. Pour la Tétracycline, les souches RZ6, RM3, RS3, RZ4, RM4 sont résistantes, les souches RZ2 RZ5 RS1, RM2, RS4 sont sensibles

-Pour Erythromycine, les souches RG3, RS3 et RM3, RM2, RS4 RZ5 RM4 sont résistantes, RM4, RS2, RS1, RZ6 sont intermédiaires.

## Résultats et discussions

-Seule la souche **RZ<sub>4</sub>** est sensible à l'Acide pipemidique, alors que RG<sub>2</sub>, RS<sub>4</sub>, RS<sub>1</sub>, RZ<sub>5</sub>, RM<sub>4</sub>, RZ<sub>6</sub>, RM<sub>6</sub>, sont résistantes, les autres souches sont intermédiaires.  
 -, seules les souches **RM<sub>4</sub> et RZ<sub>5</sub>** sont sensibles à l'Amikacine, les autres sont soit intermédiaires soit sensibles.

-Pour la streptomycine, les souches résistantes sont: **RM<sub>1</sub>, RS<sub>2</sub>, RG<sub>2</sub>, RM<sub>6</sub>, RM<sub>2</sub>, RZ<sub>4</sub>, RS<sub>1</sub>, RM<sub>4</sub>**, alors que: **RZ<sub>5</sub>, RM<sub>3</sub>, RS<sub>3</sub>, RS<sub>4</sub>, RZ<sub>6</sub>, RG<sub>3</sub>, RG<sub>1</sub>** sont intermédiaires. Pour la Lincomycine, toutes les souches sont intermédiaires à l'exception de RZ<sub>5</sub> qui est sensible.

Le **Tab.13** donne des détails des pourcentages, des souches résistantes et le nombre d'antibiotiques auxquels ces souches résistent, à premier vue on remarque que la résistance à un antibiotique, comme l'Amoxicilline par exemple peut arriver à 90% des souches.

**Tab.13.** taux de résistance des *rhizobiums* vis-à-vis des antibiotiques utilisés  
 Comparaison aux valeurs critiques (Comité française de l'antibiogramme, 2000)

Antibiotiques	% de résistance		
	Resistants	Intermédiaires	sensibles
Ac. Naludixique	13 (65 %)	7 (35%)	00 (00%)
Ac. pipemidique	6 (30 %)	9 (45%)	5(25%)
Amikacine	2(10 %)	4 (20%)	14 (70%)
Amoxicilline	18 (90%)	01 (5 %)	1 (5%)
Cefotaxine	18 (86.66 %)	1 (5%)	1 (5%)
Erythromycine	5 (25 %)	5 (25%)	10 (50%)
Kanamycine	00 (00%)	00 (0 %)	20(100%)
Gentamicine	00 (00%)	00 (0 %)	20(100%)
Vancomycine	02 (10%)	7 (35%)	11 (55%)
Tétracycline	6 (30 %)	7 (35%)	7 (35%)
Streptomycine	7 (35 %)	6(30%)	7 (35%)
Penicilline G	17 (85%)	03 (15%)	0 (00%)
Oxacilline	17 (85 %)	03 (15%)	0 (00%)
Lincomycine	00 (0 %)	19 (95 %)	1 (5%)

Alors que cette résistance est absente pour des antibiotiques comme la gentamicine et la Kanamycine. Les résultats de cette distribution sont représentés dans la **figure.19**

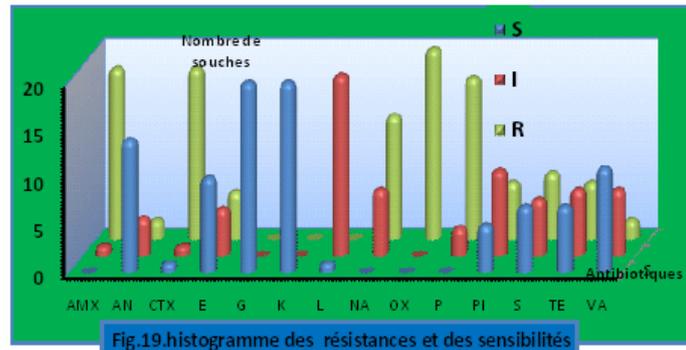


Fig.19. histogramme des résistances et des sensibilités

La résistance des souches pour 05 antibiotiques, dépasse les 65%, ce qui est très remarquable, comme phénomène physiologique chez ces bactéries, et c'est peut être, ce pouvoir de résistance, qui les caractérise sur un second plan, après leurs capacité de fixation de l'azote, probablement que c'est une forme d'adaptation dans des conditions de compétitions très agressives, que ces bactéries ont développé cette capacité de résistance.

En effet beaucoup de travaux sont réalisés dans ce contexte et différents auteurs ont rapporté l'effet des antibiotiques sur les *rhizobiums* (Cole and Elkan 1979; Hungria et al. 2001; Küçük et Kıvanç 2008; Rodriguez- Navarro et al. 2000). Dans ce sens la croissance de plusieurs souches sauvages de *Rhizobium leguminosarum* et *Rhizobium trifolii* n'est pas inhibée par l'oxacilline (Shwingamer 1967).

La Pénicilline et l'ampicilline sont connues par l'empêchement de la formation de la paroi cellulaire surtout chez les Gram- (Stanier et al.1976).

Sur un total de 48 souches de *Rhizobium japonicum* (actuellement *Bradyrhizobium japonicum*) traitées par divers antibiotiques, 60 % ont résisté à l'érythromycine, la pénicilline G et 25% à la streptomycine (Cole et Elkan 1979); alors que Hagedorn (1979) trouve que 50 isolats de *Rhizobium trifolii* ont résisté à de fortes concentrations de 11 antibiotiques (sur 15 testés, mais relativement sensibles au chloramphénicol, la streptomycine, la tétracycline, et la Vancomycine.. les *rhizobium* a croissance rapide et ceux à croissance lente, sont extrêmement résistants à l'acide naludixique (400µg.ml<sup>-1</sup>) et la pénicilline (200 µg.ml<sup>-1</sup>) (Young et Chao, 1989).

Actuellement, il est évident, que le chloramphénicol, la Kanamycine, la néomycine, la streptomycine, la tétracycline et l'érythromycine, empêchent la synthèse des protéines membranaires. La Néomycine inhibe la synthèse de l'ARN, alors que la nystatine perturbe les fonctions membranaires (Shishido et Pepper, 1990).

Mars et al. (1992) ont étudié la résistance de 13 souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* à 13 antibiotiques: Pénicilline, Streptomycine, néomycine, Kanamycine, Tétracycline, Bacitracine, Erythromycine, Auréomycine, Novobiocine, Terramycine, Chloramphénol, Acide naludixique et polymixine, ils ont trouvé que toutes les souches sont résistantes à la Streptomycine (10mg /ml), à la pénicilline (30mg/ml), tandis que 92% des souches sont résistantes à l'acide naludixique et la Novobiocine,

77% à la polymixine, 69% la néomycine, 61% au chloramphénicol, 31% à la Kanamycine, 23% le sont à l'Erythromycine et à l'auréomycine.

**Roughley et al. (1992)** rapportaient la résistance des isolats de *Bradyrhizobium* à de fortes concentrations de streptomycine. Encore, **Jagdish et Roland (1994)** ont trouvé que six souches de rhizobium (obtenues d'une collection de légumes tropicales) résistaient à la cloxacilline, la Lincomycine, la methicilline, la nafcilline, l'acide naludixique, l'oxacilline, le nitroforantoin et le sulfisoxazole.

**Sinclair et Eaglesham. (1984)** ont trouvé une corrélation positive, entre la résistance à la streptomycine et l'efficacité chez *Rhizobium trifolii*.

**Ramirez et al. (1998)** rapportent que 33 % des mutants, perdent la résistance à l'érythromycine, après le passage dans les nodules. Au contraire, la résistance de tous les mutants à l'érythromycine et à la streptomycine reste stable, après 27 générations (croissance sur YEM). D'un autre côté, **Nasr et al. (1999)** ont trouvé que l'acquisition d'une forte résistance aux antibiotiques par *Rhizobium* (RFH183 et RFH283) semble être inversement reliée à leurs efficacités.

Nos résultats indiquent la large variabilité de résistances aux 14 antibiotiques étudiés, et suggèrent qu'il est possible de sélectionner des *Rhizobiums* avec de fortes compétences de compétitivités, dans les zones d'étude, ces souches peuvent être utilisées comme des inoculants pour réussir une bonne productivité de légumineuses. Le *Rhizobium* (RM4) (isolé de la région de Maghnia) a une résistance étrangement remarquable (10 antibiotiques).

Quelques exemples des comportements des souches de *Rhizobium* à certains antibiotiques sont donnés sur la **figure 20**, on remarque de bonnes zones d'inhibition en nombre et en importance du diamètre d'inhibition. On a remarqué que des souches qui étaient au départ sensibles, deviennent résistantes après quelques repiquages le cas par exemple de la souche RS4 qui était sensible à la streptomycine (photo c), puis elle devient résistante à cet antibiotique après seulement 04 repiquages (photo e)

### 2. profil de l'antibiorésistance

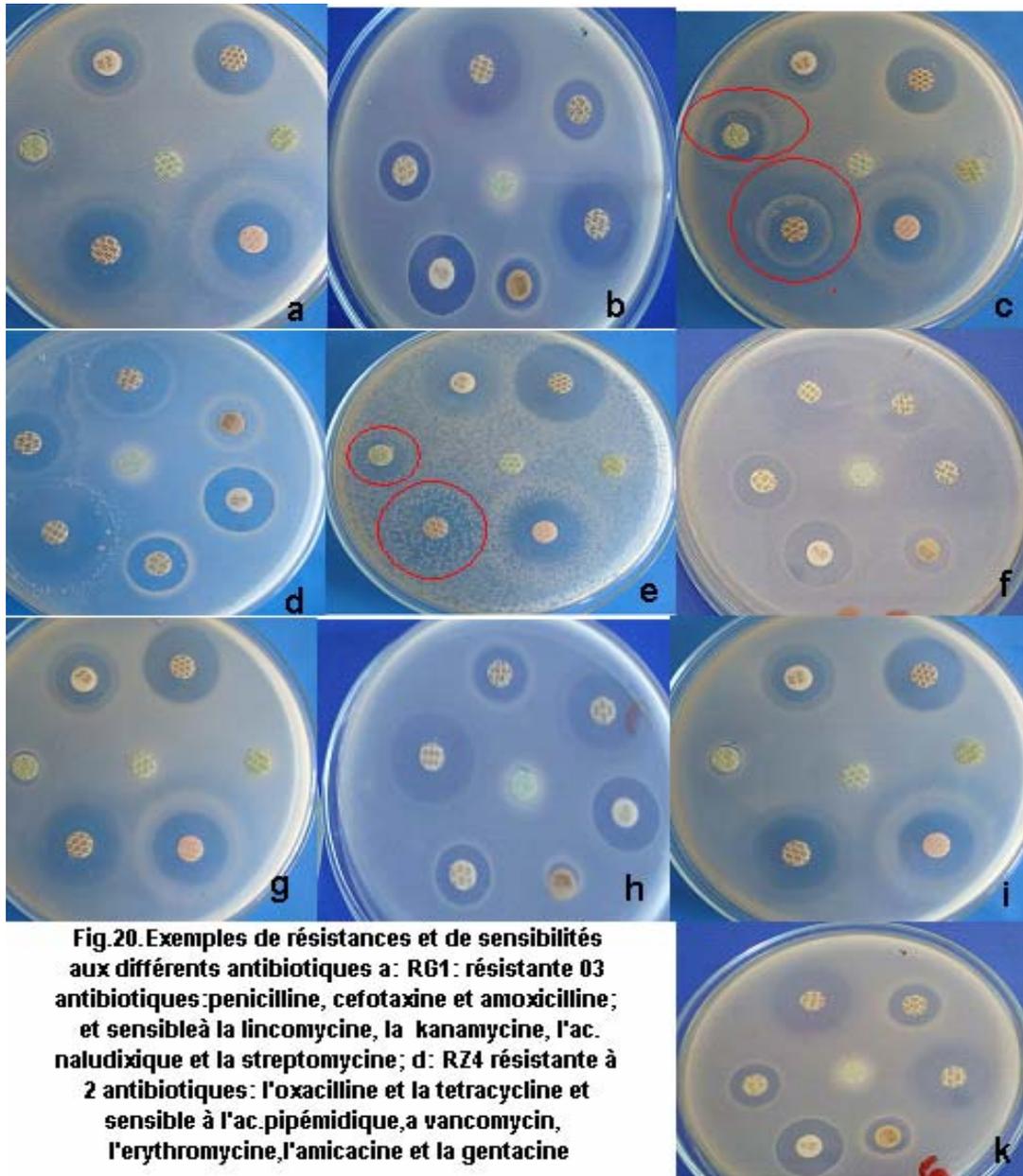
On observant le comportement des *Rhizobiums* aux antibiotiques testés, on note l'existence d'un radical de résistance commun, entre les 20 souches qui est: l'Amoxicilline, Cefotaxine, Oxacilline et Pénicilline, c'est leur premier profil de multi résistance.

Alors que le deuxième profil est celui de la résistance à: l'Amoxicilline, Cefotaxine, Oxacilline et Pénicilline+ l'acide naludixique, et bien sur il est possible de dresser d'autres profils de multi résistances.

L'existence de ces profils indique la grande diversité de la multi résistance intrinsèque chez les *Rhizobiums* des régions de prélèvement. Il est possible que le fait d'observer le premier profil le plus abondant, revient au fait que les régions de cette étude ont été déjà cultivées par la féverole pendant plusieurs années, ce qui a rendu les populations rhizobiales plus compétitives.

## Résultats et discussions

On rejoint **Zilli et al. (2004)** pour dire qu'une rhizosphère active favorise l'émergence de nouvelles résistances, grâce aux possibilités des transferts plasmidiques, finalement, l'émergence de nouvelles résistances est l'un des processus d'évolution et d'adaptation qui peut être étudié dans un temps réel, si on suit les constatations de **Salamond and Welch (2008)**.



### 3<sup>ème</sup> Partie

#### Tests d'antagonisme

#### 1. bactéries -champignons

##### 1.1. Test préliminaire: ensemencement par touche

Nous avons vérifié l'effet de chacune des 20 souches de *Rhizobium* sur la croissance de sept champignons, dont certains sont potentiellement pathogènes, pour des légumineuses et des non légumineuses. Un bon nombre de *Rhizobium* ont ralenti la croissance des champignons. Ce test préliminaire nous a donné une idée globale des souches inhibitrices et des champignons inhibés.

##### 1.1.1. Test d'une souche de *Rhizobium* contre 04 champignons

Le **tableau14** donne une première idée sur le comportement de chacune des 20 souches de *Rhizobium* (entourée par 4 champignons différents) vis-à-vis des souches des champignons. La plus part des souches ont un effet inhibiteur sur tous les champignons testés; alors que le reste des isolats ont inhibé au moins un champignon. On a remarqué que *Rhizopus stolonifère* (O1) est inhibé par le milieu Y.E M

**Tab.14.** Effets des *Rhizobium* sur la croissance des champignons

+: effets d'inhibition. *Penicillium* sp.: BT2, *Rhizopus stolonifère*: O1, *Trichoderma*: R3, *Aspergillus flavus*: O2, *Aspergillus niger*: BDB5, *Alternaria*: O11, *Fusarium oxysporum*: F16

Souches	Champignons						
	BT2	O1	O2	O11	F16	BDB5	R3
RM1	+	+	-				+
RM2			+	+	+		+
RM3	+	+	-	-			
RM4		+	+	+	+		
RM5	-	+	+		+		
RM6	+		+			+	+
RZ1				+	+	+	+
RZ2	+	+		+	+		
RZ3			+	-	+	+	
RZ4	+		+		+	+	
RZ5		+	+	+			+
RZ6	+				+	+	+
RG1	+	+				+	+
RG2		+	+		+	+	
RG3	+		+	+		+	
RG4	+	+			+		+
RS1	-	+	+	-			
RS2			-		-	-	-
RS3	-	+		-			-
RS4	-	+	-			-	

## Résultats et discussions

La **figure 21** illustre un exemple de la capacité de *Rhizobium* de ralentir la croissance de certains champignons notamment. Le genre *Penicillium* et l'espèce *A. niger*. L'inhibition dans ce cas se manifeste par l'existence d'une distance entre les limites du développement du *Rhizobium* et la limite du développement du champignon inhibé les substances inhibitrices peuvent être de natures chimiques variables. La figure (**Fig.22**) donne Un exemple de suppression totale de la croissance des champignons par la souche RM2.



**Fig. 21.** Antagonisme entre *Rhizobium* et 4 genres de champignons: *Penicillium sp*; *A.niger*, *Trichoderma (R3 et)*.*Rhizopus stolonifère*: O1

**Fig.22.** suppression totale d' *Aa.flavus* ensemencé par touche en 04 points de la surface du milieu YEM par la souche RM2



Dans cette vision, dans une étude *in vitro* **Izallalen, (1997)** a montré que *Rhizobium* à une activité antagoniste à l'encontre de *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolinifère*, *Trichoderma*, *Alternaria*. Ces antagonistes (*Rhizobium*) manifestent des actions inhibitrices et des modes d'actions

différentes vis à vis de ces pathogènes, soit par la production des antibiotiques ou bien par une autre substance antifongique, soit par une compétition entre eux.

En réalisant un test d'antagonisme **Essalmani et Lahlou (2002)** affirment que les substances inhibitrices de *R. leguminosarum* sont de nature protéique et ont une action létale sur les conidies de *Fusarium oxysporum*; de même **Gagné et al., (2009)** montrent que l'analyse de propriétés inhibitrices de *R. leguminosarum* sont liées à la sécrétion de substances antibiotiques mais ce n'est pas le cas pour toutes les souches qui semblent agir par compétition nutritive liée à une occupation rapide du milieu

### 1.1.2. Une souche de *Rhizobium* contre une souche de champignon

Le **tableau 15** donne l'ensemble des résultats qui sont obtenus après 48 heures d'incubation (une souche de *Rhizobium* ensemencée au centre de la boîte est entourée par un seul genre de champignon, ensemencé en 4 points). La sensibilité des souches de champignons se manifeste par des zones d'inhibition autour des colonies de *Rhizobium*. Le diamètre de ces zones est différent selon les souches de *rhizobium* et le champignon. Une remarque générale qui mérite d'être signalée est le caractère inhibiteur de la majorité des *Rhizobium*. la littérature scientifique préfère le terme suppression

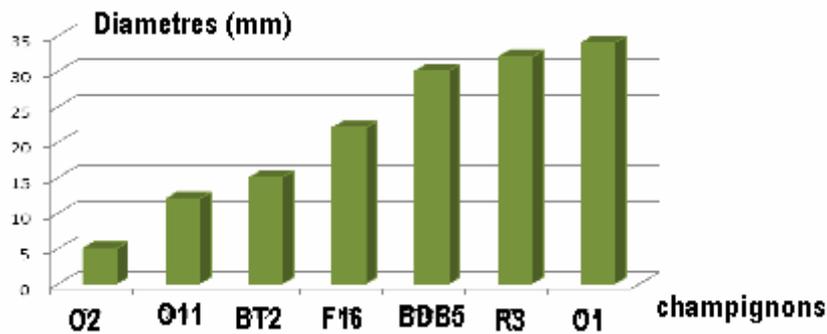
**Tab.15.** Effets suppressifs des *Rhizobiums* sur la croissance des Champignons.

*Penicillium sp.* BT2, *Rhizopus stolonifère*: O1, *Trichoderma*: R3, *Aspergillus flavus*: O2, *Aspergillus niger*: BDB5, *Alternaria*: O11, *Fusarium oxysporum*: F16

Souches							
	BT2	BDB5	R3	O1	O2	O11	F16
RM1	+	+	+	+	-	+	+
RM2	+	-	-	+	-	+	+
RM3	+	+	-	+	-	-	+
RM4	+	-	-	+	+	+	+
RM5	-	-	-	+	+	-	-
RM6	+	+	+	+	-	-	+
RZ1	-	+	+	+	-	+	+
RZ2	+	-	-	+	-	+	-
RZ3	-	+	+	+	+	-	+
RZ4	+	+	-	+	+	-	+
RZ5	-	-	+	+	+	+	-
RZ6	+	+	+	+	-	-	+
RG1	+	+	+	+	-	-	+
RG2	-	+	-	+	+	-	+
RG3	+	-	-	+	+	+	-
RG4	+	+	+	+	-	-	+
RS1	-	-	-	+	-	-	-
RS2	-	-	-	+	-	-	-
RS3	-	-	-	+	+	-	-
RS4	-	-	-	+	-	+	-

## Résultats et discussions

Le *Fusarium oxysporum* est inhibé par 12 souches de *Rhizobium* et résiste à l'ensemble des souches RS. Par contre les souches RS1 et RS2 n'ont inhibé pratiquement aucun champignon. Les diamètres des zones d'inhibition observées sont de 0,5 mm à 32mm. Le plus importante est observée chez BDB5 soit 32 mm avec RG4 (Fig. 23)



**Fig.23.**sensibilité espèces fongiques en présence de *Rhizobium* (diamètres d'inhibition) *Penicillium* sp.: BT2, *Rhizopus stolonifère*: O1, *Trichoderma*: R3, *Aspergillus flavus*: O2, *Aspergillus niger*: BDB5, *Alternaria*: O11, *Fusarium oxysporum*: F16

Les souches de *Rhizobium* de la région de Ghazaouet et Zenata semblent donner les inhibitions les plus importantes. Les meilleurs diamètres des zones d'inhibition sont observés chez les champignons: BDB5, BT2, F16, et R3. La **figure 24** illustre 3 exemples de l'action de *Rhizobium* RG1 et sur *A. niger* et champignons (RZ6 sur *Penicillium* sp: BT2). Ces résultats laissent supposer que les substances antifongiques qui sont produites par les *Rhizobium*, sont responsables du ralentissement de la croissance de ces phytopathogènes.

**Ernst et al., (1999)** ont montré que l'inhibition in vitro de *Phytophthora clandestina* par *Rhizobium trifolii*. est produite à cause de la production des antifongiques contre ce champignon. Ceci est en accord avec les conclusions récentes de **Simpfendorfer et al. (2008)** qui ont analysé les Abstractactivités du contrôle biologique de *Rhizobium* sur la gravité de la maladie sur la racine des plants (étude sous conditions de serre). Ils constatent que les isolats de *Rhizobium* provoquent une réduction importante de la croissance de *Fusarium oxysporum*.

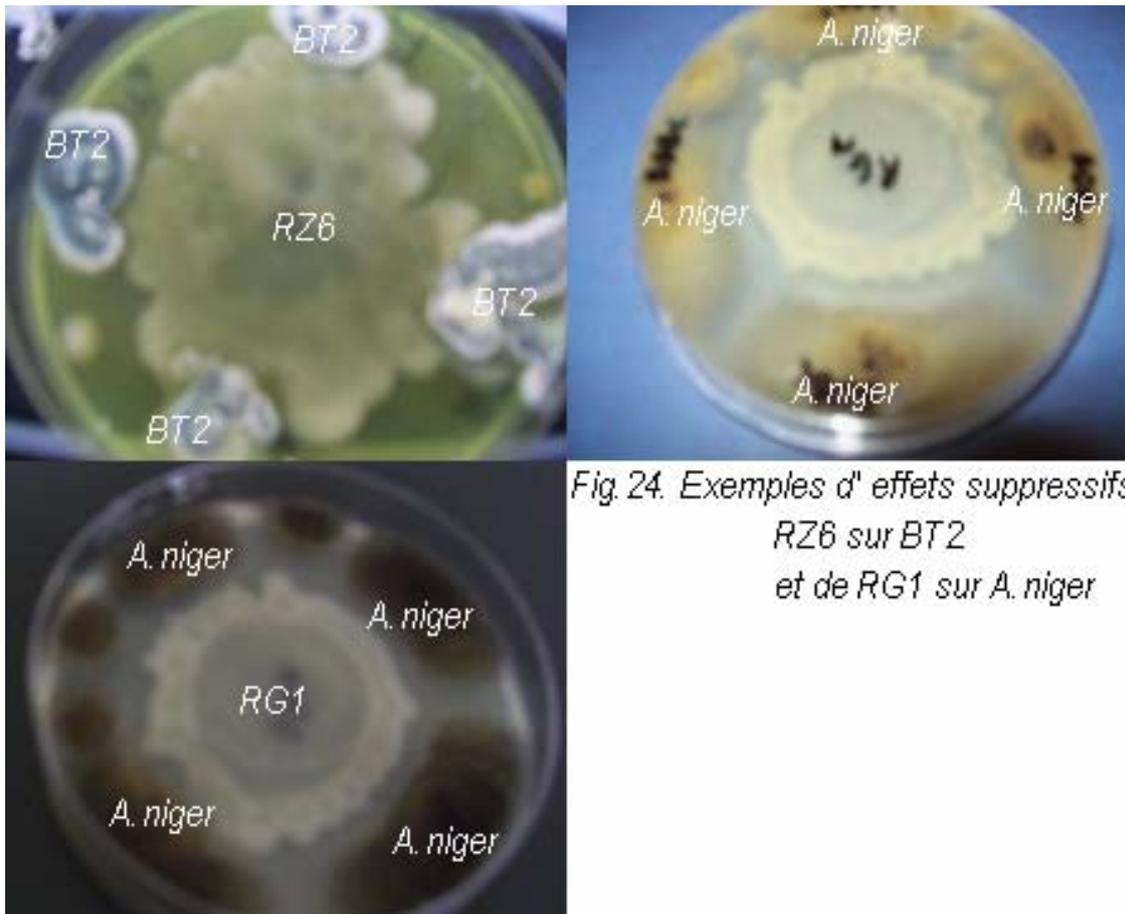
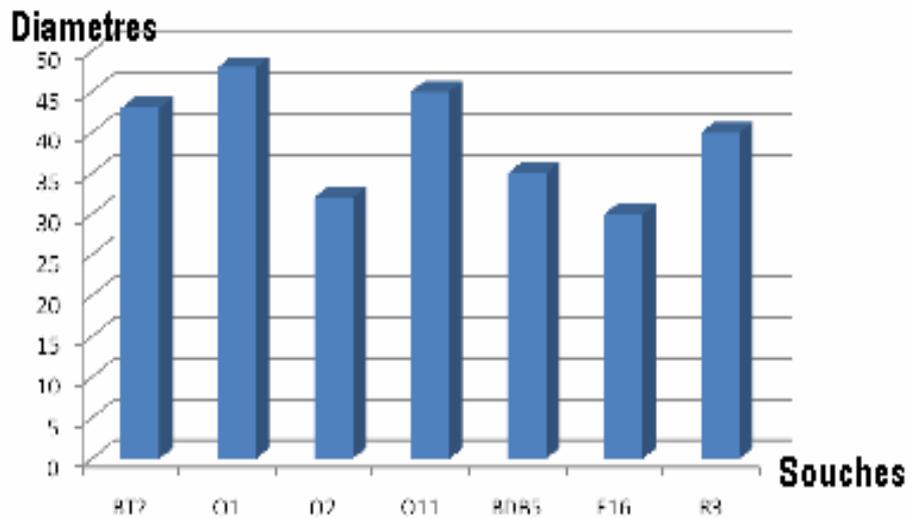


Fig. 24. Exemples d'effets suppressifs de RZ6 sur BT2 et de RG1 sur *A. niger*

Dans ce deuxième test d'ensemencement, des inhibitions plus importantes sont observées, alors les diamètres (mm) des zones d'inhibition des champignons allant de 5 à 40 mm sont observés(**Fig.25**).

D'après les résultats de ces deux tests préliminaires les champignons: *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria*, *Rhizopus stolonifère*, et *Penicillium sp.* Semblent avoir une sensibilité à l'encontre *Rhizobium sp.*

*Fusarium oxysporum* est sensible aux 12 souches de *Rhizobium* qui appartiennent à la région de Maghnia et Zenata. Ce qui concorde avec les travaux de **Antoun et al, (2009)**, qui ont trouvé que plus de la moitié (51,2%) des isolats de *Rhizobium* ont inhibé au moins un champignon, il est évident que le *Rhizobium sp.* contient des principes qui ont des effets antifongiques sur les champignons phytopathogènes.



**Fig. 25.** Diamètres d'inhibition des champignons par les souches de *Rhizobium*  
*Penicillium* sp.: BT2, *Rhizopus stolonifère*: O1, *Trichoderma*: R3, *Aspergillus flavus*: O2,  
*Aspergillus niger*: BDB5, *Alternaria*: O11, *Fusarium oxysporum*: F1

## 2.2. Test d'antagonisme: ensemencement par strie

Ce test est parmi les tests les plus appropriés. Les résultats sont rapportés sur le **tableau 16**. Ils confirment ceux obtenus dans le test préliminaire, plus de 50% de *Rhizobium* ont inhibé, si non ralenti la croissance des champignons, on remarque que chaque souche de *Rhizobium* inhibe au moins un genre de champignons et le *Fusarium oxysporum* a été inhibé par 60% des souches de *Rhizobium*. Les souches de champignons testées semblent avoir une sensibilité à l'encontre de la majorité des *Rhizobium* testés

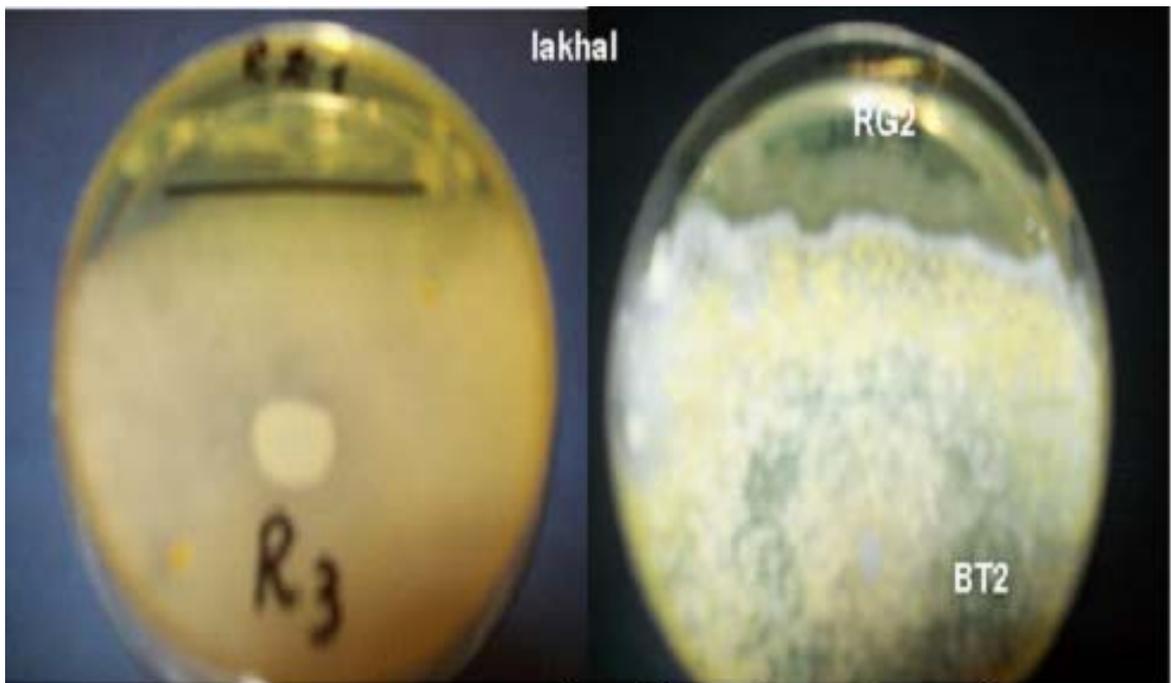
**Tab 16.** Action des *Rhizobium* sur les différents genres de champignons  
*Penicillium* sp.: BT2, *Rhizopus stolonifère*: O1, *Trichoderma*: R3, *Aspergillus flavus*: O2,  
*Aspergillus niger*: BDB5, *Alternaria*: O11, *Fusarium oxysporum*: F16

souches	Champignons						
	BT2	O1	O2	O11	F16	BDB5	R3
RM1	+	+	-	+	+	+	+
RM2	+	+	-	+	+	-	+
RM3	+	+	-	-	+	+	-
RM4	+	+	+	+	+	-	+
RM5	-	+	+	-	-	-	-
RM6	+	+	-	-	-	+	+
RZ1	-	+	+	+	+	+	+
RZ2	+	+	+	+	+	-	-
RZ3	-	+	+	+	+	+	+
RZ4	+	+	+	+	-	+	-
RZ5	-	+	+	+	+	-	+
RZ6	+	+	-	+	+	+	+
RG1	+	+	-	-	+	+	+
RG2	-	+	+	-	-	+	+
RG3	+	+	+	+	-	+	-
RG4	+	+	-	+	-	-	+
RS1	+	+	-	+	+	-	-
RS2	+	+	-	-	+	+	+
RS3	-	+	+	-	-	-	-
RS4	-	+	-	+	-	-	-

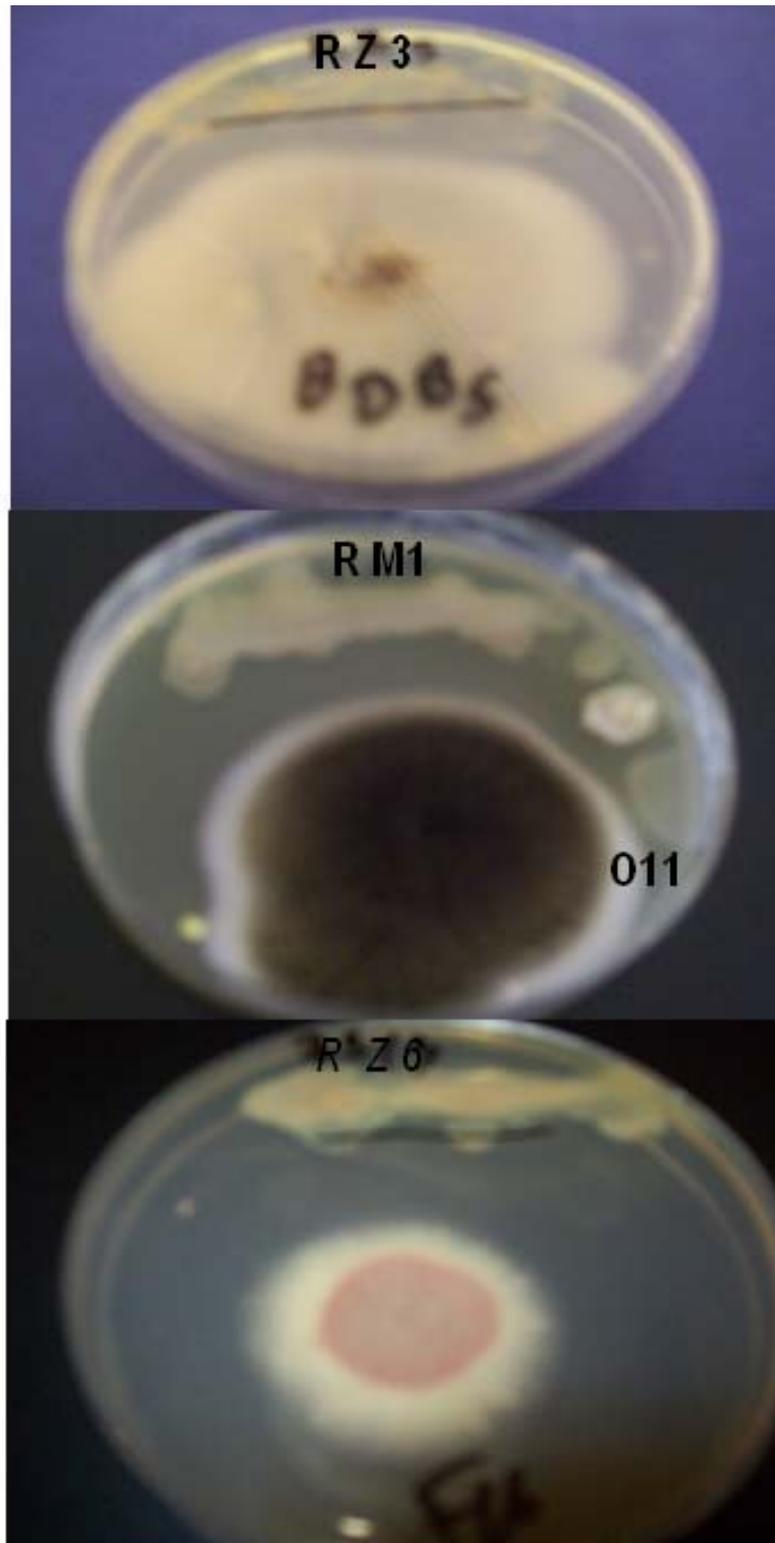
**Chakraborty** et **Chakraborty, (2006)** ont constaté que *Verticillium alboatrum* et *Fusarium oxysporum* ont été inhibés respectivement par 7,6 et 7,8% des isolats de *Rhizobium* grâce a leurs productions des polysaccharides.

Selon les travaux de **Mortimer** et *al.*, **(2007)** les *Bradyrhizobium* ont la capacité de synthétiser des Rhizobitoxine qui sont responsables de l'inhibition de 54% des champignons phytopathogènes de la rhizosphère.

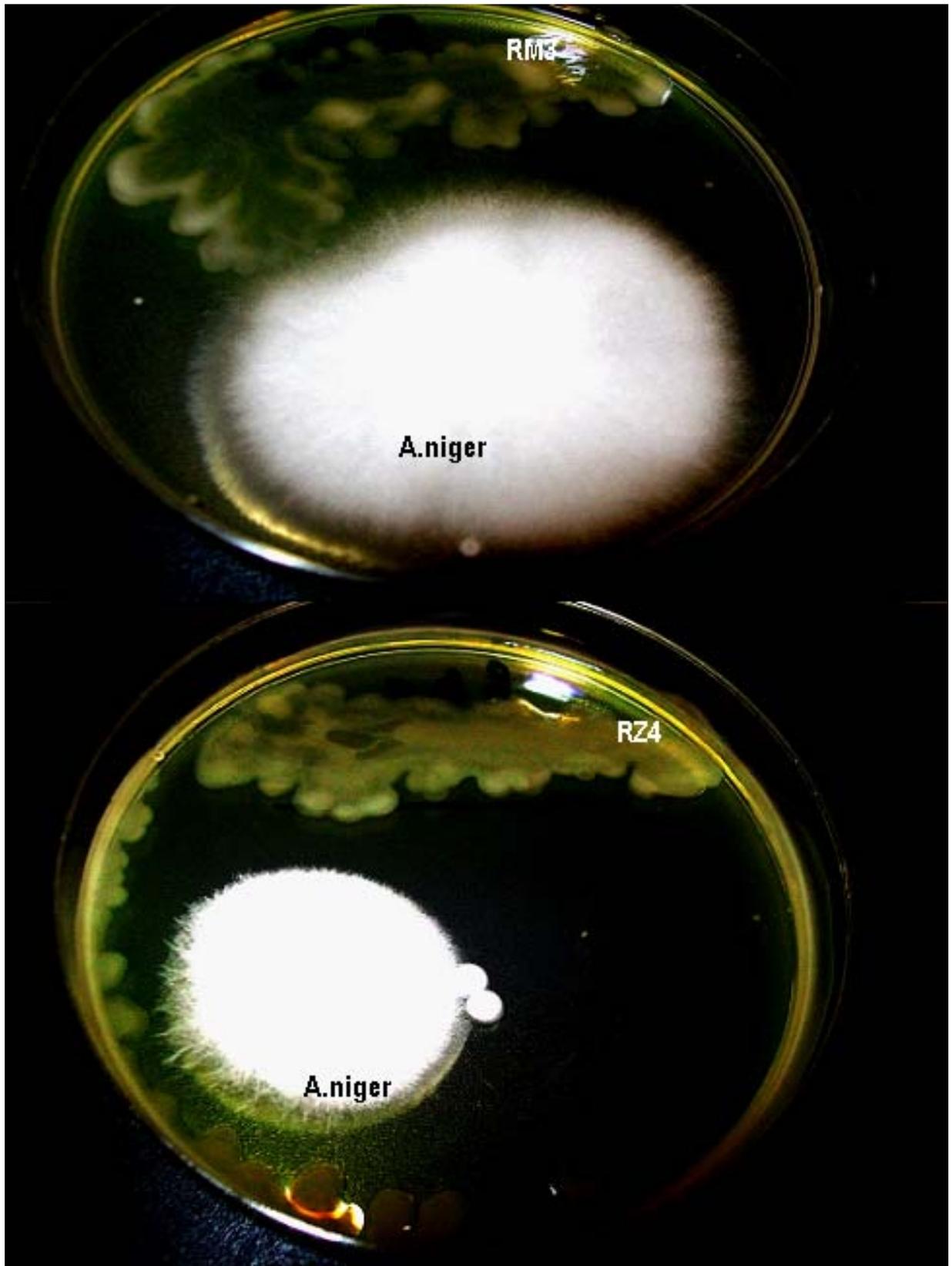
Les **figures 26** et **27** présentent quelques exemples d'inhibition des champignons par les *Rhizobiums*.



**Fig.26. Exemples d' effets suppressifs de Rizobiums:  
RZ1 sur Trichoderma R3**



**Fig.27.** Effets suppressifs de *Rhizobium*: **RZ3** sur *A. niger* (**BDB5**)  
**RM1** sur *Alternaria* (**O11**) et **RZ6** sur *F. oxysporum* **F16**.



**Fig.28.** Inhibition d'*A. niger* par les souches RM3 et RZ4

## **2.3 Test d'antagonisme: *Rhizobium*-- champignon par étalement**

### **2.3.1. Étalement de *Rhizobium***

Une souche (les 20 souches sont testées) de *Rhizobium* est cultivée avec un champignon (07 souches de genres différents sont testées) au même temps pour voir l'effet sur la croissance mycélienne des champignons.

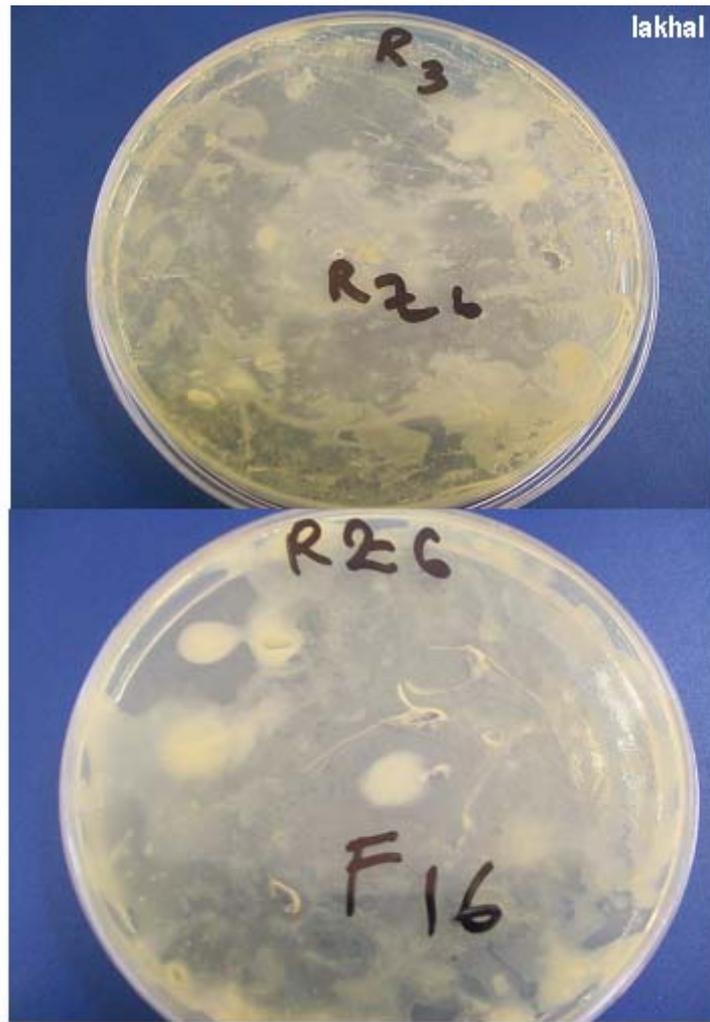
Après 2 jours d'incubation, des souches des de *Rhizobium*, à 28 ° C, aucun champignon testés n'a poussé, on est devant une suppression totale de la croissance mycélienne. Les **Fig 29 et 30** illustrent des exemples ou on observe l'absence totale du développement mycélien.

La remarque qu'on peut avancer, c'est le pouvoir de suppression très prononcé de la plus part des souches de *Rhizobium* sur les champignons, ce qui laisse a penser que ces bactéries ont vraiment des capacités nutritionnelles, qui leurs permettent de coloniser rapidement le milieu de culture et par la suite priver les souches des champignons des éléments nutritifs, donc l'impossibilité de la croissance mycélienne, chose très bénéfique dans le cadre de la lutte biologique.

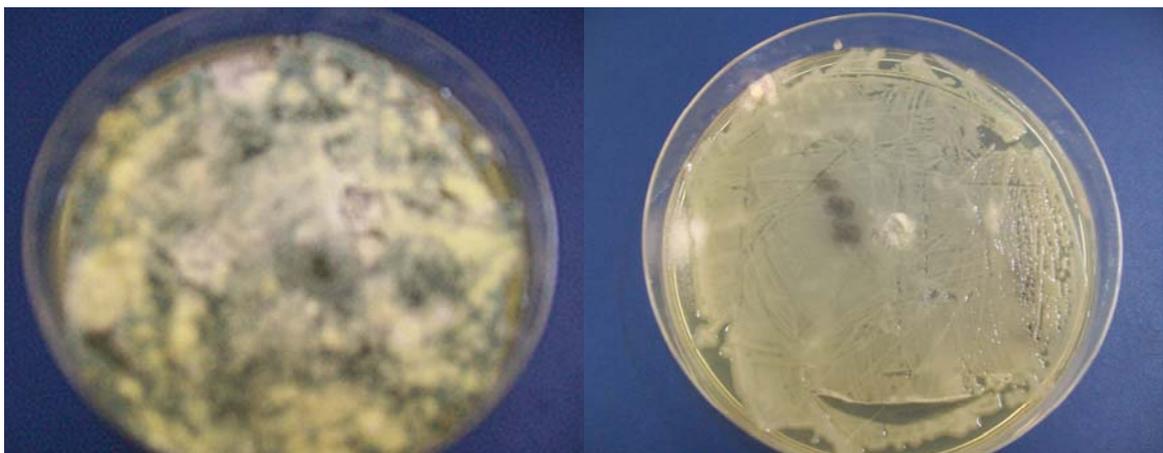
En effet **Pollack et al. (1970)** rapportent la relation entre la production de sidérophores par les *Rhizobium* et l'inhibition mycélienne.

Mais **Johnston (1967)** et **Antoun et al., (1978)** ont prouvé séparément que l'antagonisme entre le *Fusarium oxysporum* var. *avenmeum* et *Rhizobium meliloti* est effectué selon la concentration de glucose et la compétition devienne nutritive. **Guennot et al., (1990)**, ont trouvé que les sidérophores synthétisés par les *Rhizobium* favorisent la croissance des plantes et inhibent la croissance de certains champignons phytopathogènes.

L'inoculation des graines avec le *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* s'est montrée très efficace à réduire la pourriture des racines causées par le *Fusarium solani*. Des essais in vitro avec le *F. solani* et le *R. leguminosarum* biovar *viciae* montrent un aspect d'antagonisme sur milieu solide et liquide. Cependant, la croissance de champignon est retardée en culture mixte. (**Larsen et Bodker; 2001**). De nombreuses investigations permettent d'attribuer à ces microorganismes un rôle d'agent de lutte biologique. Les souches *Bradyrhizobium* AHR-2amp+, AHR-5amp+ et AHR-6amp+ sont activement antagonistes contre *Macrophomina phaseolina* (**Deshwal et al., 2003**).



**Fig.29.** Suppression totale de *Trichoderma* (R3) par le *Rhizobium* RZ6 et de *Fusarium oxysporum* F16 par le *Rhizobium* RZ6

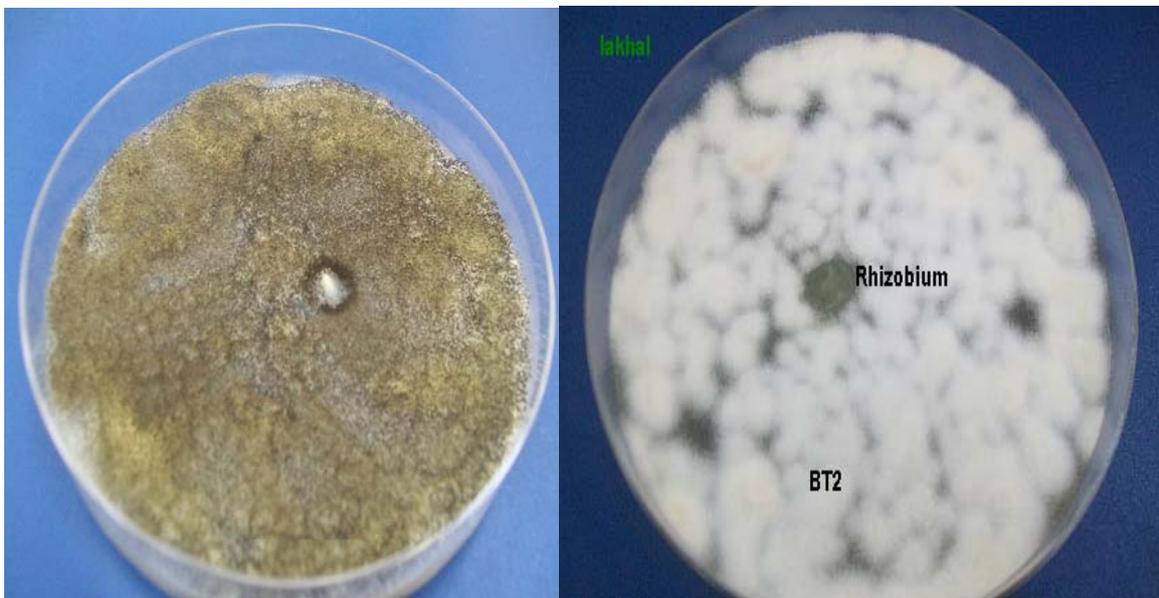


**Fig.30.** Suppression totale de la croissance d'*Aspergillus flavus*. (O2) Etouffement d'*Alternaria* sp.011 par une souche de *Rhizobium* ((J. +2)

### 2.3.2. Étalement de champignons

Après 2 jours d'incubation des champignons sur Y.E.M solide, on ajoute un inoculum de *Rhizobium* et on procède à des lectures, à partir de la troisième journée, même dans ce cas où les champignons ont de l'avance de se propager sur le milieu, les *Rhizobium* arrivent à exercer leur effet suppressif. 80% des *Rhizobium* sont suppressifs. *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp.*, *A. niger* et *Trichoderma* se trouvent les plus inhibés. Par contre seulement 10% des *Rhizobium* sont suppressifs, si le *Rhizobium* est inoculé après trois jours. La figure 31 montre que l'addition du *Rhizobium* après 4 jours d'incubation des champignons est sans effet. Ce test confirme bien que les *Rhizobium*s (dans la majorité: cas étudiés) colonisent rapidement le milieu et empêchent ainsi les phytopathogènes de proliférer.

L'ensemble de ces résultats montre clairement, que les souches que nous avons testé, ont vraiment des capacités d'antagonisme très remarquables, on a remarqué que chaque souche de *Rhizobium* inhibe au moins un genre de champignons et que *Fusarium oxysporum* a été inhibé par 12 souches de *Rhizobium*.



**Fig.31.** Etouffement de *Rhizobium* par la croissance mycélienne d'*A. niger* à gauche et de *Penicillium* à droite

## 2. filtrats des souches de *Rhizobium* - champignons

### 2.1. Tests préliminaires

Comme la précédente méthode qui consiste à un contact direct, de la souche de *Rhizobium*, on a procédé à des tests préliminaires pour adopter une méthode plus adéquate, pour des résultats plus concluants, dans cette deuxième approche on a tenté de voir l'effet du filtrat d'une souche donnée de *Rhizobium* sur la croissance d'un champignon de la collection testée.

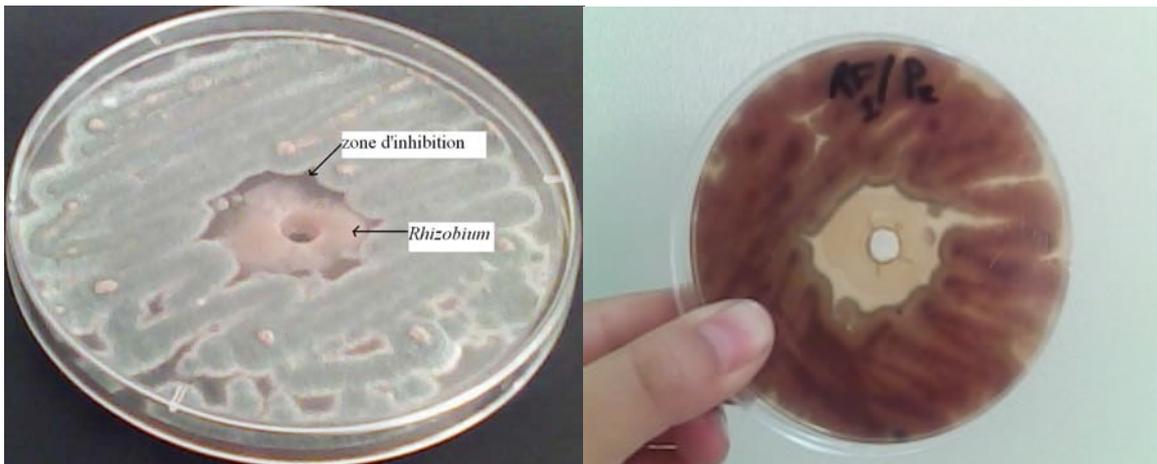
### 2.1.1. Test1: Centrifugation de la suspension sans filtration sur millipores

Une centrifugation à 6000 tours pendant 10 min n'est pas suffisante pour briser les parois des *Rhizobiums* (dans la suspension). Après 24 h de l'ensemencement d'un inoculum de ces filtrats en présence des champignons on a remarqué un envahissement bactérien de toute la surface du milieu Y.E.M. alors impossibilité de l'estimation de l'inhibition.

### 2.1.2. Test2: filtration de la suspension sur papier Watt man

Dans ce deuxième test, une centrifugation à 7000 tours pendant 15 min, puis la filtration des suspensions à travers un papier Watt man stérilisé. On a remarqué une croissance limitée des *Rhizobium*, seulement dans une zone entourant le puits rempli par le filtrat de *Rhizobium* (non pas dans toute la surface de la boîte).

Ces résultats laissent supposer que le papier Wattman n'était pas bien stérilisé donc il contamine le filtrat, ou que quelques souches de *Rhizobium* échappent à la destruction et peuvent croître même faiblement. La **figure. 32** révèle la présence de la zone d'inhibition avec la croissance des *Rhizobium* RZ1 autour du puits sur milieu YEM. Le *Penicillium* sp. s'inhibe en se rapprochant du puits contenant le filtrat rhizobial



**Fig. 32.** Effet du filtrat de *Rhizobium* RZ<sub>1</sub> sur *Penicillium* sp. BT2

## 2.2. Test avec filtration de la suspension sous vide

L'effet du filtrat (filtration sous vide, à travers un filtre de 0,45 µm) de chacune des 20 souches de *Rhizobium* sur la croissance de 4 champignons (sur une même boîte) diffère d'une souche à une autre

### 2..2.1 Méthodes de puits

L **figures 33**, illustre quelques exemples du comportement des champignons une fois en contact d'un filtrat d'une souche de *Rhizobium*.

D'après les résultats de ce test, les 4 souches de champignons testés semblent avoir une sensibilité à l'encontre des filtrats des *Rhizobium*.

## Résultats et discussions

Les filtrats ont donné un effet suppressif important sur *Penicillium sp.* et *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma*. Pour les autres champignons seulement les filtrats de **RZ<sub>1</sub>**, de **RZ<sub>4</sub>**, **RM<sub>1</sub>** et **RM<sub>2</sub>** qui ont un effet inhibiteur. Ceci est peut être du à la quantité du filtrat et par la suite de la concentration de la substance ou les substances secrétées.



**Fig. 33.** Effet des filtrats de : RZ<sub>1</sub> sur *Alternaria*. O11, RZ<sub>1</sub> sur *Penicillium sp.* BT2. RG<sub>1</sub> sur *Penicillium sp.* BT2

### 2.2.2. Méthode de disques

Le **tableau 17** donne des résultats qui sont obtenus après 48 h d'incubation à 30°C des champignons avec des disques imbibés d'une quantité déterminée du filtrat bactérien. Une sensibilité qui se manifeste par des zones d'inhibition, autour des

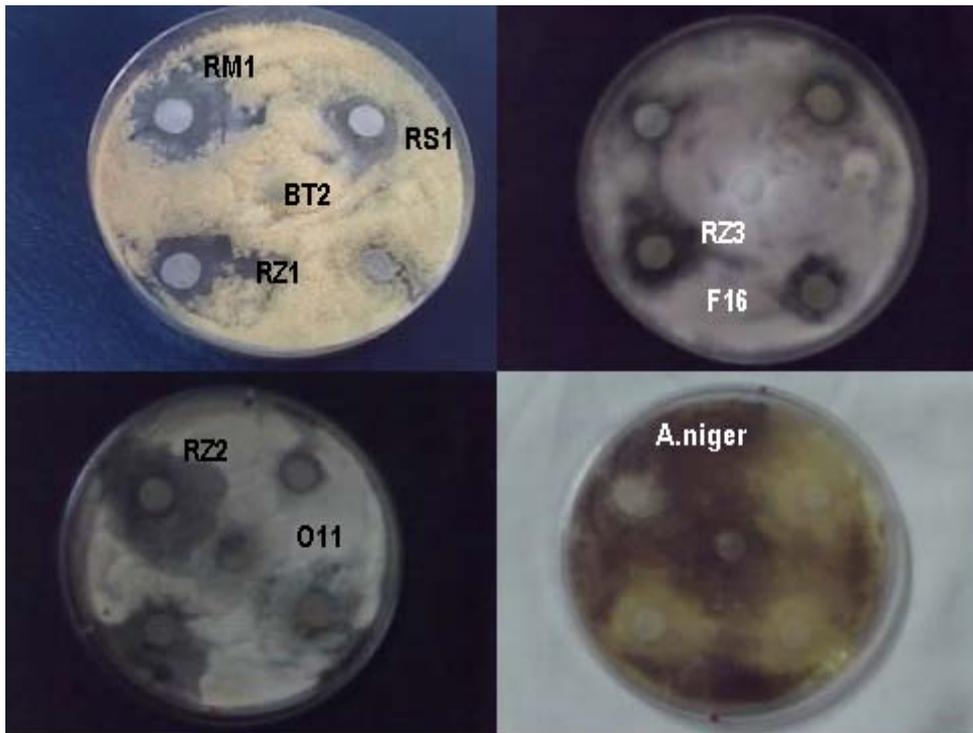
disques imbibés par les filtrats des *Rhizobium*, montre l'action inhibitrice des substances (déversées par le *Rhizobium* dans le milieu extérieur) contenues dans ces filtrats

**Tab.17.** Effets des filtrats des *Rhizobium* sur les champignons  
*Penicillium sp.*: BT2, *Rhizopus stolonifère*: O1, *Trichoderma*: R3,  
*A. flavus*: O2, *A. niger*: BDB5, *Alternaria*: O11, *Fusarium oxysporum*: F16  
 (++) : Forte inhibition (+) : légère inhibition (-) : absence d'inhibition.

souches	Champignons						
	BT2	O1	O2	O11	F16	BDB5	R3
RM1	++	+	++	+	+	+	+
RM2	+	++	+	+	+	+	+
RM3	+	++	-	-	+	+	-
RM4	+	+	+	+	+	-	+
RM5	-	++	+	-	-	-	-
RM6	+	++	-	-	-	+	+
RZ1	+	+	+	+	+	+	+
RZ2	+	+	+	++	+	-	-
RZ3	-	+	+	+	+	+	+
RZ4	+	+	+	+	+	+	+
RZ5	-	+	+	+	+	-	+
RZ6	+	+	-	+	+	+	+
RG1	+	+	-	-	+	+	+
RG2	-	+	+	-	-	+	+
RG3	-	-	-	-	-	-	-
RG4	+	+	-	+	-	-	+
RS1	+	+	-	+	+	-	-
RS2	+	+	-	-	+	+	+
RS3	-	+	+	-	-	-	-
RS4	-	+	-	+	-	-	-

Presque la totalité des filtrats des *Rhizobiums* ont un effet inhibiteur sur tous les champignons testés, les filtrats des souches **RZ<sub>1</sub>**, **RZ<sub>4</sub>**, **RM<sub>1</sub>** et **RM<sub>2</sub>** ont inhibé la totalité des champignons, mais le degré d'inhibition est différent. Le filtrat de **RM<sub>1</sub>** a fortement inhibé le *Penicillium sp.* et *Aspergillus flavus* (fig. 34)

Pour *Penicillium sp.*, seulement le filtrat de **RG<sub>3</sub>** qui n'a pas donné un effet d'inhibition. Le *Fusarium oxysporum* est inhibé par la majorité des filtrats de *Rhizobium*. L'apparition des champignons sur le disque témoin (ne contenant pas de filtrat) nous confirme que ce dernier ne contient aucune substance qui permet d'inhiber les souches fongiques.



**Fig.34.** Effets de: **RM<sub>1</sub>** et **RS<sub>1</sub>** et **RZ<sub>1</sub>** sur *Penicillium sp.*  
: **RZ<sub>3</sub>** sur, **RF<sub>2</sub>**, **RM<sub>4</sub>** et **RM<sub>5</sub>** sur *Fusarium*  
: **RZ<sub>2</sub>** sur *Alternaria*

Les diamètres des zones d'inhibition observées autour des disques ( $\emptyset$  de 9 mm) sont de 11 à 24 mm. Les plus importantes sont celles observées chez *A. flavus* en présence des filtrats des souches **RZ<sub>1</sub>** et **RZ<sub>4</sub>**.

Le filtrat d'un *Rhizobium* a inhibé au moins deux champignons testés, le filtrat de **RZ<sub>1</sub>** a donné les meilleurs diamètres d'inhibition (de 14 mm à 24 mm) pour les 6 champignons.

D'après ces données, les souches de *Rhizobium* ont produit des substances dont l'effet est suppressif sur les champignons.

Selon **Ehteshamul-Haque** et **Ghaffar, (1993)**, le groupe de *R. leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium japonicum* ont été utilisés avec succès contre les champignons pathogènes, appartenant aux genres; *Macrophomina*, *Rhizoctonia* et *Fusarium*.

De même **Antoun et al., (1998)** ont montré aussi que, sur 266 souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*, un grand pourcentage (83 %) produisait des sidérophores qui favorisent la croissance des plantes et inhibent la croissance de certains champignons phytopathogènes. **Lakhal et al., (2009)** ont constaté qu'*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Trichoderma*, *Alternaria* et *Penicillium sp.* Sont inhibés sur milieu YEM en présence de *rhizobium sp.*

## *Résultats et discussions*

Ces résultats concordent avec ceux de **Siddiqui et al., (2000)** qui ont prouvé que la réduction de la croissance fongique in vitro par certains *Rhizobium* et que la formation des zones d'inhibitions est le résultats de la libération des métabolites, par les bactéries dans le milieu de culture.

D'autres part **Ozkoc et Deliveli, (2001)** ont trouvé que la plupart des *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* ont inhibé le développement des souches fongiques: *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*.

Selon **El-Khahal et al., (2003)**, des métabolites secondaires antifongiques tels que auxines, gibbérellines, sidérophores et antibiotiques produits par le *Rhizobium* pénètrent dans le contrôle des maladies des plantes causées par des champignons pathogènes, sauf qu'**Arfaoui et al. (2006)** ont montré que seulement 08 sur 21 isolats de *Rhizobium* ont réduit significativement la croissance de *Fusarium oxysporum*.

4<sup>ème</sup> partie

**Action des composés phénoliques sur la croissance de *Rhizobium*.**

**1. Etude en milieu solide**

Le dépôt de 04 disques, imbibés chacun par un composé phénolique 4µl, sur un milieu YEM solide, ensemencé par une souche de *Rhizobium* (incubation à 4°C pendant une nuit puis à 30°C pendant 3 à 4 jours, donne les résultats présentés dans (Tab.18)

**Tab.18.** l'effet des composés phénoliques sur 20 *Rhizobium* (méthode des disques).

	souches développées	souches inhibées
hydroquinone	RZ4, RZ3, RZ2, RZ1, RS2, RS3, RM5, RG2, RM3.	RS1, RG4, RM4, RM2, RZ6, RS4, RM1, RZ5, RM6, RG3, RG1
résorescinol	RZ4, RM4, RS3, RZ6, RM6, RG3, RS4, RM2, RG4, RZ1, RM3, RG1.	RS1, RZ3, RZ2, RS2, RM5, RM1, RG2, RZ5.
phloroglucinol	RZ4, RZ3, RZ2, RS2, RS3, RM5, RG2, RS4, RZ1, RZ6, RM2, RG4, RG3, RM6.	RM4, RM1, RZ5, RM3, RG1, RS1.
pyrocatechol	RG4, RM4, RZ3, RM2, RZ6, RM5, RZ1, RM1, RG2, RZ5, RM3, RM6, RG3, RG1, RS4.	RZ4, RZ2, RS2, RS3, RS1.
Naringine	RS1, RG4, RS2, RS3, RM2, RZ6, RM5, RZ1, RG2, RZ5, RM3, RM6, RG1, RS.	RZ4, RM4, RZ3, RZ2, RG3, RM1.
Acide p-coumarique	RZ3, RZ2, RS2, RS3, RM2, RZ6, RZ1, RG2, RZ5, RM3, RG1, RM5, RG4.	RS1, RM4, RM1, RM6, RG3, RS4, RZ4.

Il ressort de ce tableau que:

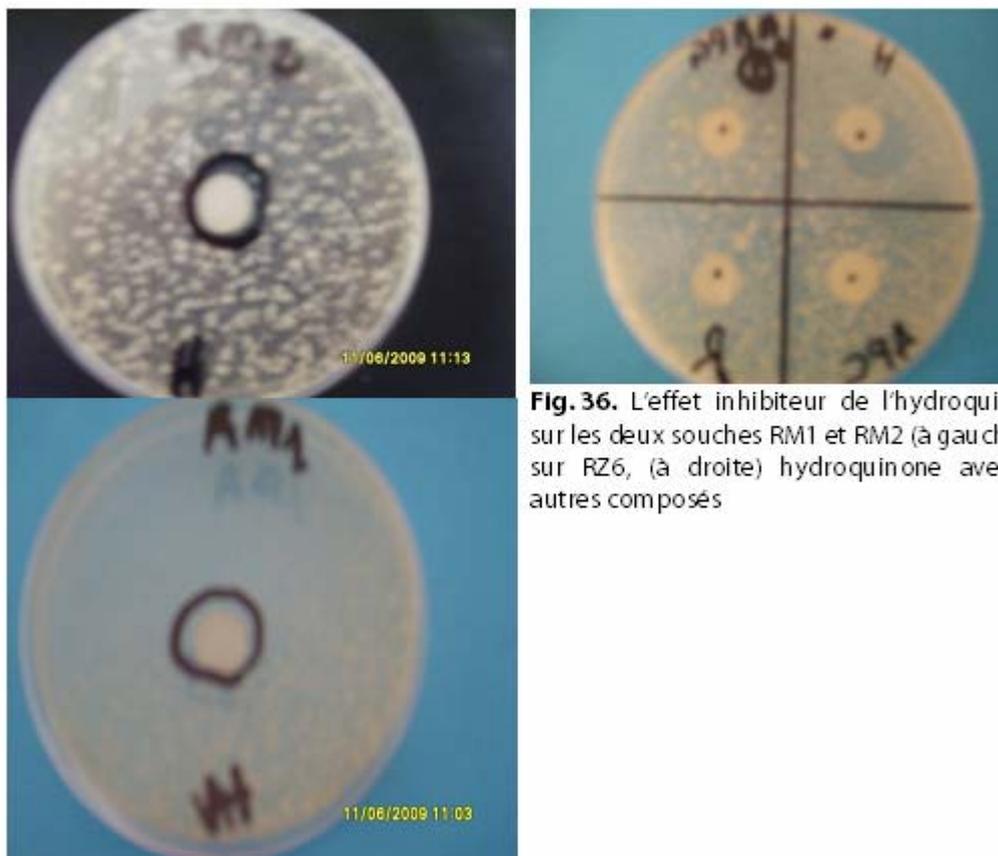
- l'hydroquinone inhibe 11 souches de *Rhizobium* et permet la croissance de 9 souches.
- le résorescinol inhibe 8 souches et permet la croissance de 12 souches
- le phloroglucinol inhibe 6 souches.
- le pyrocatechol inhibe 5 souches seulement

La série de l'expérimentation de 06 composés phénoliques a des quantités très faibles ont des effets notables sur les croissances des *Rhizobiums*, mais ceci diffère d'une souche à une autre (Fig. 35), par exemple la souche RZ6 pousse en présence du phloroglucinol, pyrocatechol, le résorescinol, l'hydroquinone et l'acide p-coumarique Que la figure.36 illustre un exemple de la capacité de l'hydroquinone a inhibé deux souches RM1 et RM2 on remarque qu'il y a une zone d'inhibition produite par l'hydroquinone et les trois autres acides: p-coumarique, résorescinol et pyrocatechol activent, un autre exemple est donné sur la figure 37

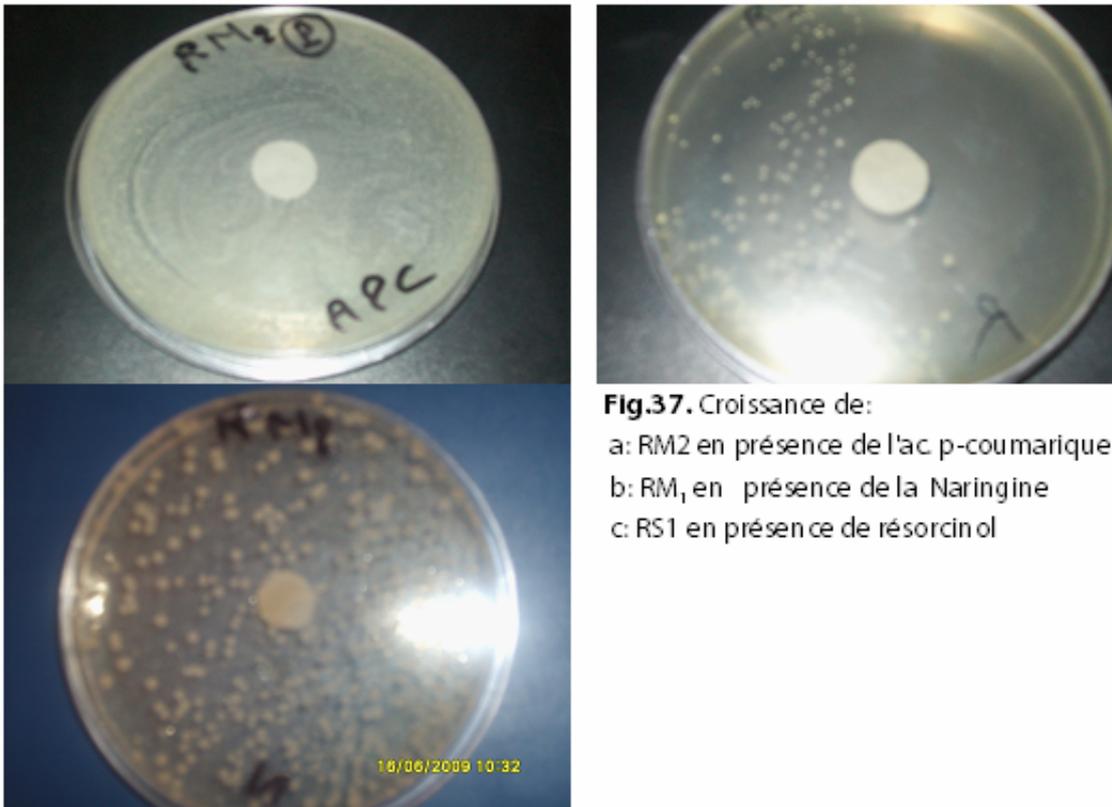
## Résultats et discussions



**Fig.35.** croissance de : RZ6 en présence de phloroglucinol, pyrocatechol, le résorcinol, L'hydroquinone et l'acide p-coumarique et de RM<sub>2</sub> et RS<sub>4</sub> en présence de la Naringine



**Fig. 36.** L'effet inhibiteur de l'hydroquinone sur les deux souches RM1 et RM2 (à gauche) et sur RZ6, (à droite) hydroquinone avec 03 autres composés



**Fig.37.** Croissance de:  
a: RM2 en présence de l'ac p-coumarique  
b: RM, en présence de la Naringine  
c: RS1 en présence de résorcinol

## 2. Etude en milieu liquide

### 2. 1. L'effet des composés phénoliques sur la croissance des *Rhizobium*

#### 2.1.1. Effet des phénols simples

##### 2.1.1.1. Effet de l'hydroquinone

Après addition de 4 $\mu$ l de l'hydroquinone sur 10 ml de suspension de la souche étudiée et incubation à 30°C, les résultats obtenus après 6 heures et 24 heures sont répertoriés dans le **Tableau.19**

On constate que l'hydroquinone active la croissance de 45% des souches de *Rhizobium* et inhibe le reste. 04 souches RM sont inhibées alors que seulement 02 sont activées. A l'opposé 02 souches RZ sont inhibées contre 04 qui sont activées, les souches RS1 et RS4 sont inhibées;

Tab.19. Effet de l'hydroquinone sur la croissance des souches de *Rhizobium*

Souches activées par hydroquinone				souches inhibées par Hydroquinone			
souches	Densité optique (D.O) Temps (heures : h)			souches	Densité optique (D.O) Temps (heures : h)		
	0	6	24		0	6	24
RZ <sub>4</sub>	0,052	0,406	0,562	RS <sub>1</sub>	0,048	0,470	0,620
RZ <sub>4</sub> +cp		0,500	0,597	RS <sub>1</sub> +cp		0,280	0,395
RZ <sub>3</sub>	0,059	0,309	0,445	RM <sub>1</sub>	0,050	0,360	0,450
RZ <sub>3</sub> +cp		0,345	0,520	RM <sub>1</sub> +cp		0,157	0,260
RZ <sub>2</sub>	0,039	0,316	0,480	RG <sub>4</sub>	0,041	0,416	0,520
RZ <sub>2</sub> +cp		0,402	0,530	RG <sub>4</sub> +cp		0,186	0,238
RS <sub>2</sub>	0,047	0,498	0,570	RM <sub>4</sub>	0,046	0,315	0,524
RS <sub>2</sub> +cp		0,480	0,559	RM <sub>4</sub> +cp		0,207	0,332
RS <sub>3</sub>	0,041	0,401	0,580	RM <sub>2</sub>	0,045	0,398	0,525
RS <sub>3</sub> +cp		0,415	0,587	RM <sub>2</sub> +cp		0,340	0,438
RM <sub>5</sub>	0,059	0,441	0,226	RZ <sub>6</sub>	0,040	0,257	0,478
RM <sub>5</sub> +cp		0,500	0,680	RZ <sub>6</sub> +cp		0,203	0,315
RZ <sub>1</sub>	0,055	0,351	0,530	RZ <sub>5</sub>	0,047	0,414	0,580
RZ <sub>1</sub> +cp		0,401	0,650	RZ <sub>5</sub> +cp		0,275	0,342
RG <sub>2</sub>	0,057	0,382	0,538	RM <sub>6</sub>	0,051	0,277	0,401
RG <sub>2</sub> +cp		0,429	0,613	RM <sub>6</sub> +cp		0,220	0,378
RM <sub>3</sub>	0,040	0,358	0,523	RG <sub>7</sub>	0,047	0,400	0,580
RM <sub>3</sub> +cp		0,400	0,671	RG <sub>7</sub> +cp		0,230	0,515
				RG <sub>1</sub>	0,049	0,310	0,435
				RG <sub>1</sub> +cp		0,251	0,317
				RS <sub>4</sub>	0,046	0,176	0,418
				RS <sub>4</sub> +cp		0,204	0,286

La **figure 38** donne un exemple de chaque cas (inhibition et activation) de deux souches représentatives, sous l'effet de l'hydroquinone

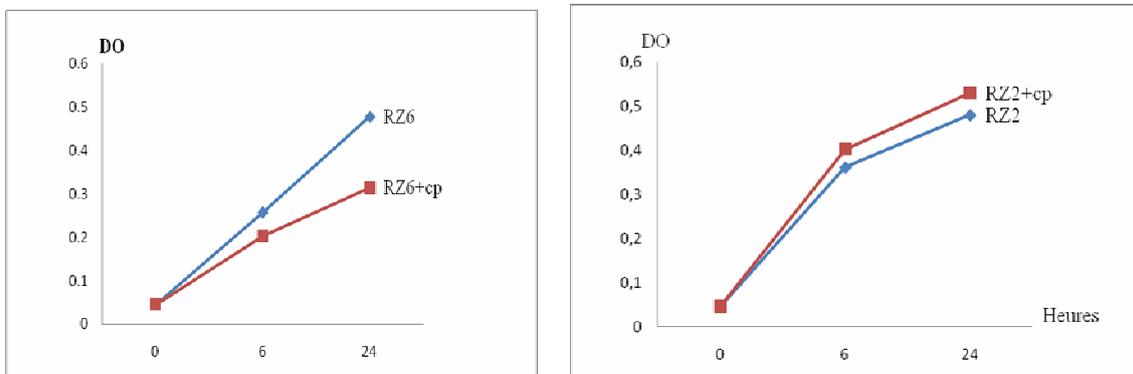


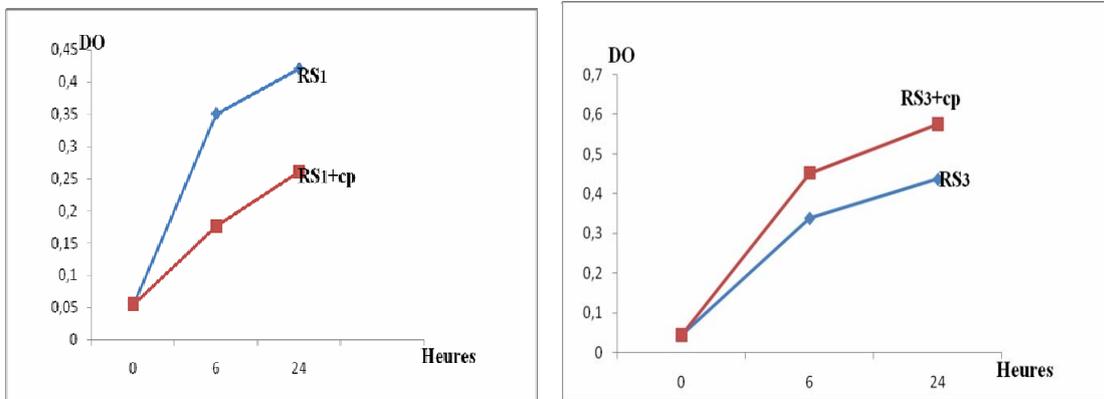
Fig.38. Evolution de la croissance avec et sans hydroquinone (RZ6 et RZ2).

La croissance bactérienne de la souche RZ<sub>6</sub> à 6 heures atteint une valeur de 0.257 qui augmente jusqu'à 0.478 après 24 heures, mais dans le cas de l'addition de 4 µl de l'hydroquinone la croissance de la souche diminue jusqu'à 0.203 (à 6 heures) et à 0.315 après 24 heures, un effet inhibiteur apparent de l'hydroquinone sur la croissance de la souche RZ<sub>6</sub> est remarqué. En contraste la souche RZ2 en absence de l'hydroquinone atteint 0.361 à 6 heures et 0.402 à 24 heures, alors qu'en présence de l'hydroquinone sa croissance augmente à 0.402 (à 6 heures) et à 0.530 (à 24 heures) une activation de la croissance de la souche RZ2 est claire.

### 2.1.1.2. Effet de résorcinol.

L'évolution de la croissance sur Y.E.M liquide, en fonction de temps, des souches RS<sub>1</sub> et RS<sub>3</sub>, avec et sans résorcinol, est illustrée par la **Fig.39** (inhibition et activation). la croissance de la souche RS<sub>1</sub> sans résorcinol déterminée par DO donne de 0.350 (après 6 heures) et à 0.420 après 24 heures alors qu'en présence de ce composé elle est de 0.176 après 6 heures et de 0.260 après 24 heures, au contraire la croissance de RS<sub>3</sub> présente 0.339 et 0.453 après 06 et 24 heures (respectivement), alors quelle donne des valeurs supérieures (0.437 et 0.576 ) à ces temps , sans résorcinol, on conclue que le résorcinol à un effet inhibiteur sur RS<sub>1</sub> et activateur sur RS<sub>3</sub> . Le **Tableau.11** résume les résultats (6h et 24 h) obtenus après l'addition de 4µl de résorcinol à 10 ml de suspension de chaque souche étudiée.

On remarque que sur milieu liquide le résorcinol active 45% des souches et inhibe 55%, alors que sur milieu solide , contenant le même composé phénolique 60% des souches sont activées et 40% sont inhibées.



**Fig.39.** Evolution de la croissance (avec et sans résorcinol) de RS<sub>1</sub> et RS<sub>3</sub>

**Tab.20. Effet du Résorcinol sur la croissance des souches de *Rhizobium***

<i>Les souches activées par résorcinol</i>				<i>Les souches inhibées par résorcinol</i>			
souches	Densité optique (D.O)			souches	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures : h)				Temps (heures : h)		
	0	6	24		0	6	24
RZ <sub>4</sub>	0,052	0,259	0,444	RS <sub>1</sub>	0,058	0,350	0,420
RZ <sub>4</sub> +cp		0,368	0,505	RS <sub>1</sub> +cp		0,176	0,260
RM <sub>4</sub>	0,057	0,248	0,540	RZ <sub>3</sub>	0,059	0,450	0,610
RM <sub>4</sub> +cp		0,362	0,620	RZ <sub>3</sub> +cp		0,420	0,320
RS <sub>3</sub>	0,039	0,339	0,437	RZ <sub>2</sub>	0,050	0,340	0,590
RS <sub>3</sub> +cp		0,453	0,576	RZ <sub>2</sub> +cp		0,312	0,540
RZ <sub>6</sub>	0,042	0,213	0,350	RS <sub>2</sub>	0,048	0,478	0,565
RZ <sub>6</sub> +cp		0,195	0,290	RS <sub>2</sub> +cp		0,430	0,407
RM <sub>6</sub>	0,042	0,290	0,480	RM <sub>5</sub>	0,051	0,418	0,620
RM <sub>6</sub> +cp		0,350	0,549	RM <sub>5</sub> +cp		0,280	0,490
RG <sub>3</sub>	0,055	0,299	0,442	RM <sub>1</sub>	0,049	0,182	0,445
RG <sub>3</sub> +cp		0,454	0,651	RM <sub>1</sub> +cp		0,170	0,280
RS <sub>4</sub>	0,058	0,174	0,215	RG <sub>2</sub>	0,055	0,343	0,616
RS <sub>4</sub> +cp		0,183	0,257	RG <sub>2</sub> +cp		0,235	0,350
RM <sub>2</sub>	0,051	0,300	0,472	RZ <sub>5</sub>	0,056	0,205	0,520
RM <sub>2</sub> +cp		0,285	0,459	RZ <sub>5</sub> +cp		0,125	0,440
RG <sub>4</sub>	0,054	0,259	0,439				
RG <sub>4</sub> +cp		0,440	0,458				
RZ <sub>1</sub>	0,039	0,346	0,543				
RZ <sub>1</sub> +cp		0,290	0,650				
RM <sub>3</sub>	0,042	0,252	0,445				
RM <sub>3</sub> +cp		0,323	0,496				
RG <sub>1</sub>	0,056	0,288	0,460				
RG <sub>1</sub> +cp		0,276	0,387				

**2.1.1.3. Effet de phloroglucinol.**

L'étude de la croissance (DO en fonction de temps) des souches RZ<sub>5</sub> et RM<sub>4</sub> sur Y.E.M liquide contenant le Phloroglucinol donne les résultats présentés dans la **figure 40**, Sur milieu liquide ce composé active 35% et inhibe 65% des souches de *Rhizobium*

**Tableau.21**

## Résultats et discussions

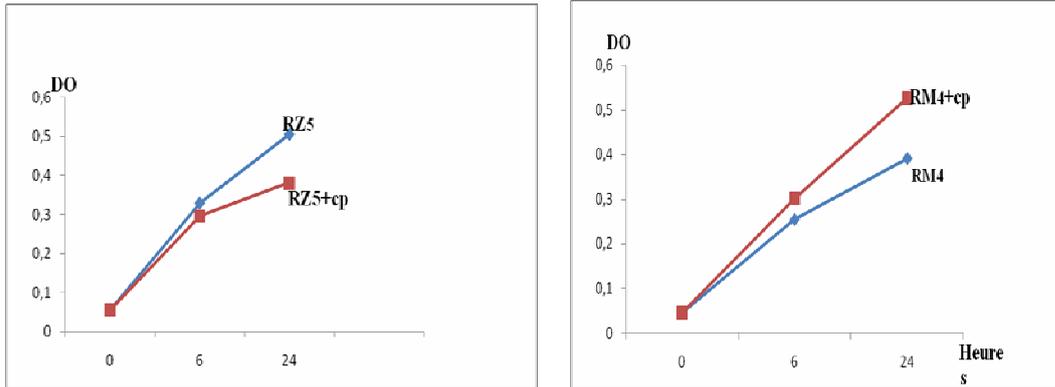


Fig.40. évolution de la croissance (avec et sans Phloroglucinol) de RZ<sub>5</sub> et de RM<sub>4</sub>

Tab.21. Effet du phloroglucinol sur la croissance des souches de *Rhizobium*

Les souches Inhibées par phloroglucinol			
	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures : h)		
	0	6	24
RM <sub>1</sub>		0,358	0,780
RM <sub>1</sub> +cp	0,050	0,383	0,525
RZ <sub>5</sub>		0,329	0,505
RZ <sub>5</sub> +cp	0,050	0,296	0,381
RM <sub>3</sub>		0,329	0,605
RM <sub>3</sub> +cp	0,045	0,437	0,496
RS <sub>1</sub>		0,186	0,330
RS <sub>1</sub> +cp	0,050	0,227	0,280
RZ <sub>4</sub>		0,112	0,540
RZ <sub>4</sub> +cp	0,055	0,180	0,504
RZ <sub>2</sub>		0,322	0,485
RZ <sub>2</sub> +cp	0,055	0,168	0,233
RS <sub>2</sub>		0,385	0,605
RS <sub>2</sub> +cp	0,050	0,369	0,572
RS <sub>3</sub>		0,242	0,255
RS <sub>3</sub> +cp	0,055	0,236	0,227
RM <sub>5</sub>		0,530	0,701
RM <sub>5</sub> +cp	0,045	0,324	0,311
RG <sub>2</sub>		0,306	0,532
RG <sub>2</sub> +cp	0,055	0,285	0,462
RS <sub>4</sub>		0,455	0,660
RS <sub>4</sub> +cp	0,055	0,276	0,346
RZ <sub>1</sub>		0,380	0,520
RZ <sub>1</sub> +cp	0,055	0,214	0,248
RM <sub>2</sub>		0,470	0,840
RM <sub>2</sub> +cp	0,055	0,416	0,735

Les souches activées par phloroglucinol			
	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures : h)		
	0	6	24
RM <sub>4</sub>		0,254	0,391
RM <sub>4</sub> +cp	0,045	0,302	0,527
RG <sub>1</sub>		0,221	0,511
RG <sub>1</sub> +cp	0,050	0,267	0,513
RZ <sub>3</sub>		0,165	0,376
RZ <sub>3</sub> +cp	0,055	0,173	0,405
RZ <sub>6</sub>		0,357	0,620
RZ <sub>6</sub> +cp	0,045	0,405	0,700
RG <sub>4</sub>		0,315	0,532
RG <sub>4</sub> +cp	0,045	0,375	0,583
RG <sub>3</sub>		0,258	0,567
RG <sub>3</sub> +cp	0,045	0,330	0,620
RM <sub>6</sub>		0,418	0,535
RM <sub>6</sub> +cp	0,045	0,490	0,545

2.1.1.4. Effet de pyrocatechol

La **figure 41** illustre deux exemples de l'action activatrice et inhibitrice de pyrocatechol sur les souches de *Rhizobium* RM6 et RZ2, le **tableau 22** récapitule l'ensemble des densités optiques obtenues avec et sans ce composé. Le pyrocatechol active 70% des souches inhibe 30%. Il présente un aspect plus activateur qu'inhibiteur.

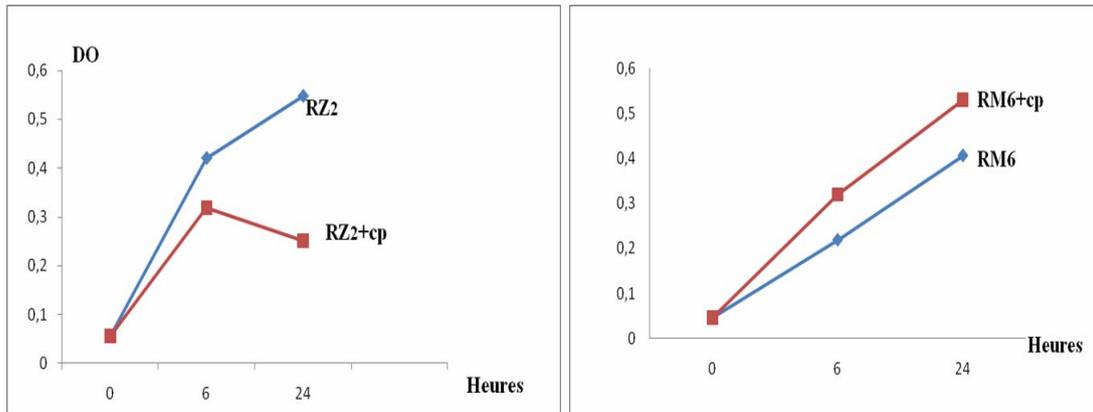


Fig.41. Evolution de la croissance (avec et sans pyrocatechol) des souches RZ<sub>2</sub> et RM<sub>6</sub>

Tab.22 : Effet du pyrocatechol sur la croissance des souches de *Rhizobium*

Les souches inhibées par le pyrocatechol			
souches	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures :h)		
	0	6	24
RZ <sub>4</sub>	0,055	0,319	0,420
RZ <sub>4</sub> +cp		0,232	0,400
RZ <sub>2</sub>	0,055	0,420	0,547
RZ <sub>2</sub> +cp		0,318	0,250
RS <sub>2</sub>	0,055	0,440	0,650
RS <sub>2</sub> +cp		0,270	0,309
RS <sub>3</sub>	0,050	0,243	0,397
RS <sub>3</sub> +cp		0,203	0,305
RS <sub>1</sub>	0,050	0,364	0,516
RS <sub>1</sub> +cp		0,290	0,207
RS <sub>4</sub>	0,045	0,310	0,580
RS <sub>4</sub> +cp		0,280	0,463

Les souches activées par le pyrocatechol			
souches	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures : h)		
	0	6	24
RM <sub>6</sub>	0,045	0,219	0,407
RM <sub>6</sub> +cp		0,320	0,531
RZ <sub>6</sub>	0,045	0,270	0,500
RZ <sub>6</sub> +cp		0,352	0,546
RM <sub>4</sub>	0,045	0,301	0,413
RM <sub>4</sub> +cp		0,390	0,482
RM <sub>5</sub>	0,045	0,205	0,392
RM <sub>5</sub> +cp		0,270	0,468
RG <sub>4</sub>	0,055	0,219	0,515
RG <sub>4</sub> +cp		0,300	0,635
RM <sub>3</sub>	0,045	0,199	0,302
RM <sub>3</sub> +cp		0,310	0,516
RG <sub>2</sub>	0,055	0,280	0,453
RG <sub>2</sub> +cp		0,350	0,480
RM <sub>2</sub>	0,045	0,180	0,316
RM <sub>2</sub> +cp		0,255	0,471
RZ <sub>3</sub>	0,055	0,200	0,582
RZ <sub>3</sub> +cp		0,315	0,578
RG <sub>3</sub>	0,045	0,211	0,360
RG <sub>3</sub> +cp		0,323	0,532
RG <sub>1</sub>	0,045	0,200	0,472
RG <sub>1</sub> +cp		0,385	0,610
RZ <sub>1</sub>	0,045	0,250	0,539
RZ <sub>1</sub> +cp		0,273	0,600
RZ <sub>5</sub>	0,045	0,190	0,447
RZ <sub>5</sub> +cp		0,297	0,536
RM <sub>1</sub>	0,045	0,290	0,345
RM <sub>1</sub> +cp		0,363	0,513

**2.1.2. Effet de Flavanones**

**2.1.2.1. Effet de la naringine**

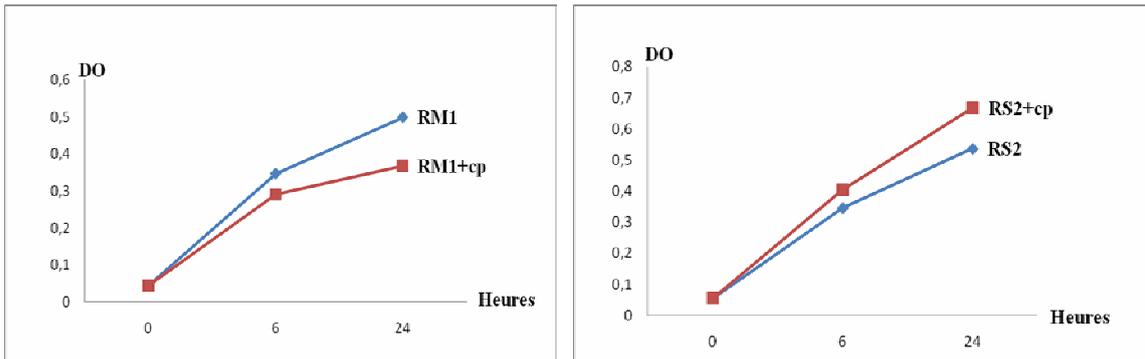
La Naringine active 70% des souches de *Rhizobium* et inhibe 30% (**Tab.23**)  
 Donc, les résultats reproduisent ceux obtenus sur milieu solide, de même, cette substance active plus qu'elle inhibe (dans les conditions de notre mode opératoire).

**Tab.23. Effet de la naringine sur la croissance des souches de *Rhizobium***

<i>Les souches inhibées par naringine</i>				<i>Les souches activés pour naringine</i>			
souches	Densité optique (D.O)			souches	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures : h)				Temps (heures : h)		
	0	6	24		0	6	24
RZ <sub>4</sub>		0,388	0,484	RS <sub>1</sub>	0,059	0,171	0,293
RZ <sub>4</sub> +cp	0,045	0,233	0,260	RS <sub>1</sub> +cp		0,200	0,310
RM <sub>4</sub>		0,423	0,531	RG <sub>4</sub>	0,049	0,300	0,428
RM <sub>4</sub> +cp	0,050	0,401	0,351	RG <sub>4</sub> +cp		0,321	0,515
RZ <sub>3</sub>		0,489	0,538	RS <sub>2</sub>	0,054	0,346	0,537
RZ <sub>3</sub> +cp	0,050	0,280	0,310	RS <sub>2</sub> +cp		0,405	0,668
RZ <sub>2</sub>		0,450	0,488	RS <sub>3</sub>	0,049	0,258	0,440
RZ <sub>2</sub> +cp	0,050	0,270	0,311	RS <sub>3</sub> +c		0,291	0,560
RG <sub>3</sub>		0,395	0,528	RS <sub>3</sub>	0,038	0,249	0,460
RG <sub>3</sub> +cp	0,050	0,303	0,396	RS <sub>3</sub> +cp		0,356	0,502
RM <sub>1</sub>		0,348	0,500	RZ <sub>6</sub>	0,040	0,403	0,500
RM <sub>1</sub> +cp	0,045	0,290	0,368	RZ <sub>6</sub> +cp		0,539	0,630
				RM <sub>5</sub>	0,050	0,417	0,551
				RM <sub>5</sub> +cp		0,583	0,643
				RZ <sub>1</sub>	0,058	0,313	0,406
				RZ <sub>1</sub> +cp		0,400	0,420
				RG <sub>2</sub>	0,053	0,440	0,580
				RG <sub>2</sub> +cp		0,562	0,614
				RZ <sub>5</sub>	0,042	0,473	0,500
				RZ <sub>5</sub> +cp		0,470	0,480
				RM <sub>3</sub>	0,055	0,286	0,401
				RM <sub>3</sub> +cp		0,297	0,495
				RM <sub>6</sub>	0,053	0,492	0,513
				RM <sub>6</sub> +cp		0,516	0,580
				RG <sub>1</sub>	0,058	0,237	0,380
				RG <sub>1</sub> +cp		0,326	0,417
				RS <sub>4</sub>	0,058	0,249	0,446
				RS <sub>4</sub> +cp		0,496	0,563

L'étude de la croissance (D.O en fonction de temps) des souches RM<sub>1</sub> RS<sub>2</sub> sur Y.E.M liquide contenant la Naringine donne les résultats illustrés par la **figure 42** qui donne deux exemples sur l'inhibition et l'activation des souches de *Rhizobium* par le naringine.

On remarque par exemple que la présence de naringine diminue la croissance de la souche RM<sub>1</sub> de 0.348 à 0.290 après 6 heures et de 0.500 jusqu'à 0.368 à 24 heures alors on dit que naringine a un effet inhibiteur sur la souche RM<sub>1</sub>.



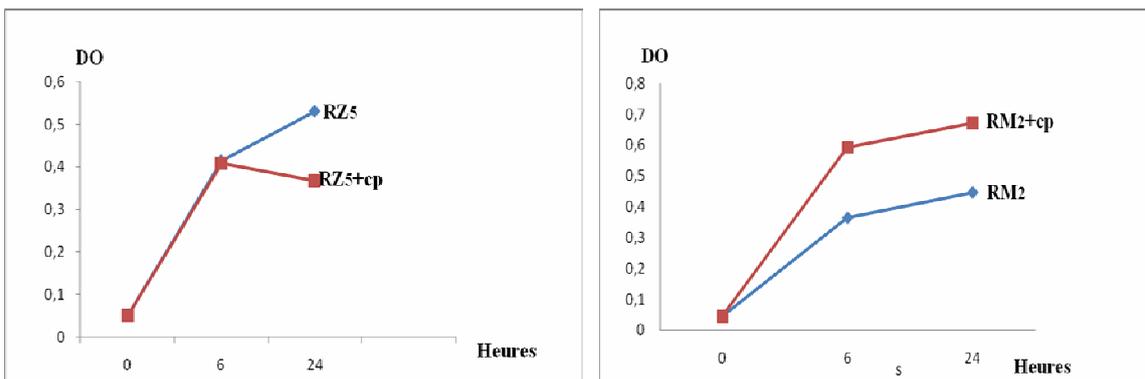
**Fig.42.** Evolution de la croissance ( avec et sans naringine) de RM<sub>1</sub> et de RS<sub>2</sub>

### 2.3. Effet des acides phénoliques

#### Effet de l'acide p-coumarique

**Tableau 24** qui montre que l'acide p-coumarique active 13 souches et inhibe 7 souches.

Un exemple de l'étude de la croissance (D.O en fonction de temps) des souches RZ<sub>5</sub> et RM<sub>2</sub> sur Y.E.M liquide contenant l'acide p- coumarique est donné sur la figure **Fig.43**. Les résultats obtenus sont donnés en détail dans le **Tableau 24**.



**Fig.43.** Evolution de la croissance d (avec et sans p-coumarique) de RZ<sub>5</sub> et RM<sub>2</sub>

D'après la figure on remarque que la souche RZ<sub>5</sub> est inhibée par l'acide p-coumarique mais après 6 heures de l'incubation à 30°C. La souche RM<sub>2</sub> elle est activée dès les premières heures de l'incubation. Sur milieu liquide l'acide p-coumarique inhibe 60% des souches.

Tab.24 : Effet de l'acide p-coumarique sur la croissance des souches de *Rhizobium*

souches activées par l'ac. p-coumarique			
souches	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures: h)		
	0	6	24
RZ <sub>3</sub>	0,045	0,319	0,410
RZ <sub>3</sub> +cp		0,458	0,529
RZ <sub>2</sub>	0,045	0,155	0,207
RZ <sub>2</sub> +cp		0,233	0,240
RS <sub>2</sub>	0,045	0,504	0,563
RS <sub>2</sub> +cp		0,691	0,765
RM <sub>2</sub>	0,045	0,365	0,447
RM <sub>2</sub> +cp		0,592	0,672
RZ <sub>6</sub>	0,050	0,581	0,647
RZ <sub>6</sub> +cp		0,384	0,536
RG <sub>2</sub>	0,045	0,280	0,305
RG <sub>2</sub> +cp		0,312	0,361
RZ <sub>5</sub>	0,050	0,414	0,530
RZ <sub>5</sub> +cp		0,408	0,367
RG <sub>1</sub>	0,045	0,350	0,385
RG <sub>1</sub> +cp		0,447	0,560
RG <sub>4</sub>	0,055	0,475	0,592
RG <sub>4</sub> +cp		0,536	0,662
RZ <sub>1</sub>	0,045	0,506	0,544
RZ <sub>1</sub> +cp		0,526	0,547

souches inhibées par l'ac. p-coumarique			
souches	Densité optique (D.O)		
	Temps (heures: h)		
	0	6	24
RG <sub>3</sub>	0,055	0,380	0,600
RG <sub>3</sub> +cp		0,220	0,538
RS <sub>1</sub>	0,054	0,350	0,540
RS <sub>1</sub> +cp		0,230	0,410
RS <sub>4</sub>	0,055	0,212	0,364
RS <sub>4</sub> +cp		0,255	0,224
RM <sub>1</sub>	0,055	0,200	0,585
RM <sub>1</sub> +cp		0,225	0,508
RM <sub>4</sub>	0,050	0,360	0,570
RM <sub>4</sub> +cp		0,354	0,500
RM <sub>6</sub>	0,045	0,222	0,533
RM <sub>6</sub> +cp		0,197	0,446
RS <sub>3</sub>	0,055	0,462	0,593
RS <sub>3</sub> +cp		0,382	0,341
RZ <sub>1</sub>	0,055	0,548	0,616
RZ <sub>1</sub> +cp		0,500	0,503
RM <sub>3</sub>	0,050	0,316	0,368
RM <sub>3</sub> +cp		0,306	0,224
RM <sub>5</sub>	0,050	0,523	0,597
RM <sub>5</sub> +cp		0,360	0,464

Pour discuter ou interpréter des résultats, qui présentent des variabilités, prudence est nécessaire, mais une comparaison avec d'autres travaux, permet de plus de logique, plusieurs auteurs relèvent cette différence de comportement des souches de *rhizobium* à l'égard de ces composés phénoliques, certains attribuent ceci à la compétence génétique de chaque souche, alors que d'autres parlent de concentrations qui peut être soit activatrice ou le contraire, voici quelques exemples des constatations:

Des composés tels que le catéchol, l'acide p-coumarique, l'acide gentisique, l'acide salicylique, l'acide vanillique ont été reconnus comme inhibiteurs des *rhizobiums* (Ranga et al., 1973).

Un nombre de composés phénoliques des téguments des graines a été identifié comme toxines pour les *rhizobiums*. Une grande partie de ces substances sont des flavonoïdes telles que la myrcétine, la quercétine et la myrcitrine (Siqueira et al., 1991)

**Firmin et al., 1986; Zaat et al., 1988 ; Novak et al., 1995** ont trouvé que le Naringénine (4',5,7-trihydroxyflavanone) et la hespérite (3',5,7- trihydroxy-4'-methoxyflavanone) ont été utilisés comme des composés, ayant une activité d'induction sur les gènes nod de *R. leguminosarum bv.viciae*. alors qu'elle inhibe l'induction des gènes nod de *S .meliloti* (**Peters et long ., 1988**) et certains souche de *B. japonicum* (**Kosslak et al.,1990**), chez le pois, son application dans le rhizosphère atteint un effet délétère avec des basses températures sur la nodulation (**Ahlawat et al., 1998**)

Un effet **stimulant** des gènes nod de *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* a été signalé par ce composé avec 0.1 et 1 µgml<sup>-1</sup> après l'inoculation, à 10 µg.ml<sup>-1</sup>, elle **inhibe** les gènes nod de cette bactérie. (**Novac et al ., 2002**). Il a été montré que la Naringénine à une forte affinité pour la membrane cytoplasmique, cette liaison a été dépendante du pH, très élevé à un PH de 5.7 et pas plus présent à un pH de 9.7.

Concernant la naringine, nos résultats corroborent avec ceux de **Zaat et al. (1987) qui constate que** 2.5 nM de naringine est suffisante pour induire l'expression des gènes nod. son effet est **positive** sur *R meliloti* nodulant *Alfalfa* (**Jain et al., 1990**), *Rhizobium Léguminosarum bv.viciae* **métabolise** la naringine ( **Rao and Cooper., 1994**),**mais** Son accumulation dans la membrane cytoplasmique de *cette bactérie* sans conversion métabolique apparent a été observé par **Recourt et al.,(1989)**,

Selon **Rao and Cooper ., 1994** *Rhizobium leguminosarum* métabolise la quercétine en la clivant en phloroglucinol et acide protocatéchique.

D'après les constatations de **Hopper et Mahadevan (2004)** *Bradyrhizobium japonicum* **tolère** jusqu'à 40 mM de Phloroglycinol., 40 mM de résorcinol, 10 mm de hydroxiquinol (dérivé de l'hydroquinone) et 30 mM de l'acide protocatéchiques.

*Rhizobium Loti* **dégrade** la quercétine en produisant l'acide protocatéchique (acide benzoïque) et du phloroglucinol, l'acide protocatéchique sert comme source de carbone chez quelques *Rhizobium* (**Rao et al., 1991**).

La quercétine **inhibe** les gènes nod chez *Vicia faba* et les **active** chez *Phaseolus vulgaris*. **Hungria et al., 1991** et le Kaempférol **inhibe** complètement l'induction de gènes nod des exsudats racinaires de *Vicia Sativa*. **Recourt et al., (1991)**

L'application de l'acide sallisalique sur les racines de soja inhibe la nodulation (**Lian et al (2000)** et inhibe complètement la formation des nodules indéterminés chez la vesce, le pois et la luzerne et il n'affecte pas la formation des nodules déterminés chez l'haricot, le lotier et le soja. (**Van spronsen et al., 2003**) , il **inhibe** la croissance de *Mesorhizobium Loti*. (**Stacey et al., 2006**).

*Bradyrhizobium* et *Rhizobium sp* **dégradent** la catéchine en acide protocatéchique et en acide *phloroglucinolcarboxilique*. **Gajendiran et Mahadevan ., (1988)**

*R. leguminosarum* incubé avec la Naringénine ou l'apigénine produit des facteurs nod (Tsr: thick, short root; Hai: root hair induction,..) chez *Vicia sativa* (Zaat et al., 1987)

Mandal et al., (2009) montre que la présence de 1.5 µg.ml<sup>-1</sup> de l'acide protocatéchique favorise une stimulation maximale de 2.5 fois de l'acide indolacétique (IAA) qui est une auxine produit par *Rhizobium* et qui **régule leur croissance**, en plus il a été montré que les nodules endogènes contiennent trois acides très abondants : l'acide p-coumarique, l'acide protocatéchique et l'acide 4-hydrox benzaldéhyde.

De plus, il a été démontré que les gènes de nodulation sont non exprimés dans les cellules en culture libre, mais ils sont activés par les signaux chimiques de la plante hôte.

**Il est très difficile d'établir une généralisation concernant la spécificité chimique des composés qui induisent les gènes Nod, car l'effet de ces composés sur les rhizobia dépend de leur concentration.**

La concentration des protéines secrétées dans le cas de la présence des *S meliloti* avec sa plantes hôte croit à plus de 49% (Clelia et al., 2008).

Quand deux phénols inducteurs simultanément présents dans les exsudats végétaux à de très faibles concentrations (inférieures à 10nm, on observe un effet de **synergie** qui disparaît au contraire pour des concentrations plus élevées pouvant alors conduire à une **inhibition**. (Hartwig., 1990).

Les composés aromatiques sont toxiques lorsqu'ils sont présents à une forte concentration, mais à une faible concentrations ils peuvent jouer le rôle de chimiotaxie positive pour *les Rhizobium* où ils peuvent être utiliser comme substance de croissance (Sequiera et al., 1991). il est possible d'induire la production de l'acide acétique par les flavonoïdes chez le *Rhizobium* (Prinsen et al., (1991)

Donc on peut conclure que ces composés peuvent jouer le rôle d'activateurs chez certains souches de *Rhizobiums* et d'inhibiteurs chez d'autres, ceci revient sans doute aux capacités de régulations génétiques chez ces bactéries.

Bien que la génistéine inhibe l'induction des *R. leguminosarum bv.viciae* et *trifoli* (Firmin et al., 1986), dans la symbiose *Alfalfa-Rhizobium meliloti* la lutéoline (flavone) stimule l'induction des gènes nod, la nodulation et la fixation d'azote. Kapulnik et al. (1987).

Zhang et Smith (1995), (Pan et Smith, 2000.) a constaté que le pré incubation de *Bradyrhizobium japonicum* avec la génistéine (isoflavones) accélère le développement de nodules limité par des basses températures. Younes (2001) à constaté que les extraits des acides phénoliques (0.02 mg/disque) des écorces de résineux n'ont pas d'effet d'inhibition sur la croissance du *Rhizobium*

### **3. Traitement statistique**

D'après l'analyse par l'ANOVA 2 a deux facteurs pour chaque souche associée à un test de comparaison de Tukey:

R carré = 88,35 % R carré (ajust) = 81,47 %

R indique une observation ayant une valeur résiduelle normalisée importante à des intervalles de confiance simultanés de Tukey = 95,0 %, L'effet temps est très significatif (P=0),

-L'effet global du deuxième facteur (Croissance avec ou sans composé phénolique) est aussi globalement significatif (p=0.016).

L'exemple de la signification de l'effet de l'hydroquinone, par rapport aux autres composés est trop clair, puisque le P se rapproche de zéro est s'éloigne de 0.05 (5%), rappelant que nous avons signalé l'effet d'inhibition prononcé de ce composé pour plus de 60 % des souches. De même le phloroglucinol se distingue du résorcinol par l'importance de son effet (P=0.082), un nuage de points des deux facteurs est donné en **annexe 4**.

Finalement en termes de pourcentage on peut procéder à des comparaisons entre la croissance (Par la DO) pour ce faire, par exemple, si après 24 heures la D.O. de la souche RZ6 sans naringine est de 0.293 et avec naringine est de 0.31: elle est activée (par la naringine) à 20%, de même elle l'est à 13% par le phloroglucinol et à 9% par le pyrocatechol, mais inhibée à 35% par le l'hydroquinone et à 18% par l'ac. p c et le résorcinol.

La souche RS1 est activée seulement par la naringine à 13% et est inhibée par le pyrocatechol à 40%, l'hydroquinone à 38 %, le résorcinol à 36 % et par le phloroglucinol à 16%

La souche RM1 est inhibée par la naringine à 27%, le résorcinol à 37% l'hydroquinone à 43%, l'acide p- coumarique à 13% et le phloroglucinol à 33%. Mais fortement activée par le pyrocatechol à 48%

Ce qui revient à dire que les souches (au moins du même genre) réagissent différemment au même composé phénolique et à la même concentration.

Puisque nous avons testé la même concentration de chaque composé phénolique, sur chacune des 20 souches et la réaction était différente, d'une souche à une autre et d'un composé d'un autre, par conséquent, il est trop hâtif de généraliser une constatation pour une souche de *Rhizobium*, voire une espèce, pour l'ensemble des *Rhizobiums*. C'est peut être ceci qui fait que toutes ces contradictions reviennent obligatoirement à la souche testée et non (au moins) à la nature du composé utilisé.

# *Conclusion générale*

## Conclusion générale

L'atmosphère terrestre est constituée de 80% d'azote, un élément indispensable à la croissance des plantes. Sa fixation est le second plus important processus biochimique après la photosynthèse. La carence en cet élément constitue l'un des principaux facteurs limitant la production agricole.

La fixation de l'azote par la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses présente un intérêt économique et agronomique considérable, en limitant l'utilisation des engrais azotés (nitrates) qui sont coûteux et polluants, et en augmentant le stock d'azote du sol pour produire un bon compte des protéines alimentaires de qualité sanitaire.

Cette fixation est due à la capacité des légumineuses à établir des symbioses avec des bactéries du genre *Rhizobium* qui conduit à la formation de nodules au sein desquels les bactéries sont capables d'assimiler l'azote de l'air.

L'infection de la légumineuse par le *Rhizobium* met en jeu un échange de signaux moléculaires spécifiques, en réponse aux flavonoïdes émis par la plante, les gènes *Nod* communs et spécifiques de la bactérie sont transcrits.

La capacité des *Rhizobium* à former des nodosités fixatrices d'azote dépend fortement de plusieurs facteurs tels que : pH, température, la salinité et les antibiotiques. Ceci nous a poussé à rechercher des souches tolérantes ces facteurs.

Certaines souches isolés (des 4 régions de prélèvement) répondent d'une façon remarquable à des conditions de stress, il existe une variabilité de réponses entre ces souches vis-à-vis à ces conditions. La majeure partie d'entre elle s résistent a plus de cinq des 14 antibiotiques testés, cette antibiorésistance intrinsèque est un signe de leurs compétitivité envers d'autres populations microbiennes, ce caractère peut être un critère taxonomique ou au moins un marqueur écologique pour ces souches.

La région dans laquelle nous avons récupéré nos souches est une région qui possède des populations des *Rhizobium* très infectifs,

Il existe un grand intérêt à trouver d'autres approches de contrôle pour l'utilisation des microorganismes dans les stratégies de lutte biologique pour les maladies des cultures

Les différentes approches en génétique, biologie et biochimie ont permis de mieux comprendre les interactions entre plantes et microorganismes dans le contexte de l'immunisation de l'hôte végétal. Ces interactions peuvent avoir lieu entre des Phytopathogènes et le *Rhizobium*. L'infection de féverole par le *Rhizobium* met en jeu un antagonisme microbien entre le *Rhizobium* et les champignons.

Concernant la plante de féverole qui contient un regain d'intérêt, avec une progression régulière des surfaces. Sa résistance aux champignons phytopathogènes

## Conclusion générale

du sol en fait une bonne alternative à plusieurs cultures contaminées par ces champignons. Cette culture rencontre également un intérêt croissant en agriculture biologique dans des nombreuses régions.

La recherche des souches qui inhibent la croissance des champignons phytopathogènes est une contribution pour vérifier les potentialités d'antagonisme et de compétition des souches (locales) de *Rhizobium*, comme agent de lutte biologique contre les pathogènes.

On a testé 20 souches de *Rhizobium* sur 7 souches de champignons phytopathogènes, Cependant, la suppression des espèces fongiques varie selon les souches de *Rhizobium* qui présentent des degrés d'inhibition différents.

Les souches de *Rhizobium* de provenance de Zenata et de Maghnia ont des capacités de suppression plus importantes que les souches de Souahlia qui n'ont pas ce pouvoir. Ceci est peut être du aux conditions édaphiques de chaque région.

12 souches de *Rhizobium* sur 20 ont un pouvoir de suppression de la croissance des champignons. La souche RZ6 inhibé presque la totalité des champignons testés.

L'analyse génétique de la régulation de la production des substances antifongiques ou de Sidérophores peut nous permettre de vérifier le pouvoir de suppression des phytopathogènes par les *Rhizobium*

Les résultats montrent que le pyrocathécol et le Naringine sont des activateurs de la plupart des souches étudiées c'est à dire si les exsudats racinaires contient ces deux composés, la bactérie peut les métaboliser et par la suite il y a possibilité de fixation, mais lorsque la bactérie est inhibée il n'y a ni nodulation ni fixation de l'azote atmosphérique. La concentration du composé phénolique peut être déterminante dans l'activation ou l'inhibition. Peut être que l'étude de l'effet unitaire donne une appréciation des comportements des souches à son égard, peut être que la concentration et la nature de la substance effectrice sont déterminantes de l'état d'activation ou de l'inhibition

Dans certains cas l'effet semble très remarquable, un seuil de différences entre les densités optiques entre le témoin et le test. La nécessité d'une analyse statistique s'impose pour affirmer ou infirmer tel ou tel résultat.

L'hydroquinone présente une action inhibitrice sur la majorité des souches, ce composé est connu par sa toxicité sur les cellules animales en particulier, l'exploitation des résultats dans de prochaines recherches sur d'autres types de cellules s'avère d'un très grand intérêt

L'effet combiné de plusieurs composés peut donner une idée plus claire, puisque

## Conclusion générale

Les *Rhizobiums* sont exposés à un flux d'exsudats racinaires contenant des composés phénoliques essentiellement. Une grande diversité des *Rhizobiums* (en Amérique latine, Canada, Mexique, en Chine, sur le pourtour de bassin méditerranéen, en Afrique (Soudan, Sénégal, Maroc, Tunisie, Lybie, Afrique du sud)) a été mise en évidence ces dernières années.

Il reste certainement encore beaucoup à découvrir puisque seules des dizaines d'espèces de *Rhizobium* sont jusqu'à présent nommées pour quelque 19000 légumineuses répertoriées. En particulier en ce qui concerne les acacias, de nombreux nouveaux groupes de *Rhizobiums* ont été identifiés par différentes équipes dans le monde, pour lesquels un travail de caractérisation polyphasique est nécessaire pour aboutir à une révision dans la taxonomie.

Notre pays doit promouvoir ces études de biotechnologie qui visent la fertilisation des sols par l'introduction des souches de *Rhizobium* dans les sols appauvris pour atteindre plusieurs objectifs :

- Augmentation des surfaces cultivées et réduire ainsi la facture de l'importation des denrées alimentaires.

- Protection de l'environnement par une lutte biologique (éviter l'utilisation des engrais chimiques et les problèmes de santé publique dont-ils sont liés).

Le transfert d'une capacité de fixation symbiotique de l'azote, même modeste, aux céréales reste un objectif désirable que les travaux actuels permettent d'entrevoir. Un travail est en cours qui vise à mettre en relief les capacités des *Rhizobiums* à inhiber les *Verticillium*-champignons phytopathogènes qui causent des pertes considérables pour l'agriculture. Il serait intéressant de voir d'autres caractères tels la production de sidérophores.

Au terme de cette étude, les souches de *Rhizobium* de la région de Tlemcen vu qu'elles nodulent *Vicia faba*, peuvent être considérées comme des souches de *Rhizobium léguminosarum biovar viciae*, ces souches sont très compétitives, par leurs capacités de multi-résistance aux antibiotiques et peuvent faire l'objet de souches d'inoculation, dans des zones de stress et des cultures sujettes à des infections par des champignons phytopathogènes

*Références  
bibliographiques*

## References bibliographiques

1. **Abaidoo R. C., George T., Bohlool B. B. and Singleton P. W. (1990):** Influence of evaluation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strain on field grown soybean and common bean, Canadian. Journal of Microbiology. pp. 36, 92-96.
2. **Abdelgadir A.H. and Alexander M. (1997):** Procedures to enhance heat resistance of *Rhizobium.plant* and soil. 188: pp 93-100.
3. **Abou-Zeid N.M., EL-Morsy G.A., Hassanein A.M and Arafa M.K. (1997):** Major organisms causing. Root-rot wilt and their relative importance on faba bean, lentil and chickpea. Egypt. J. Agric. Res., PP. 75 (3); 529-542.
4. **Abramovitch R.B. and Martin G.B. (2004):** Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defences. Curr. Opin. Plant Biol.pp. 7: 356-364.
5. **Achouak W., Christen R., Barakat M., Martel M.H. and Heulin T. (1999):** *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp.49; 787-794.
6. **Ahlawat A., Jain V., and Nainawatee H.S. (1998):** Effect of low temperature and rhizospheric application of naringenin on pea-*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* symbiosis. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. **7**: 35-38.
7. **Alami Y., Champolivier L., Merrin A. and Thierry Heulin, (1999):** Oléagineux, Corps Gras, Lipides : Rôle de *Rhizobium* sp. dans l'agrégation du sol rhizosphérique du tournesol: conséquences sur la croissance et la résistance de la plante à la contrainte hydrique. Vol. 6. No 6. pp. 524-528.
8. **Ali M. B. (1999):** Variability among soybean (*Glycine max*) cultivars in response to genistein pre-incubated *Bradyrhizobium japonicum*. Thèse de doctorat, 3ème cycle Institut National Polytechnique, Toulouse.
9. **Allen E. k. and Allen O. N. (1950):** Biochemical and symbiotic properties and symbiotic properties of the Rhizobia. Bact. Rev. pp. 14; 273-330.
10. **Amarger. N., Macheret V. and Laguerre G. (1997):** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 47; 996-1006.
11. **Antoun H. (2009):** Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera astragalus in the loss description of rhizobium. *Can.Journal of bacteriology.* PP. (6): 160-162.
12. **Antoun H., Beauchamp C.J., Goussard N., Chabot R. and Lalande R. (1998):** Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Rhaphanus sativus* L.). *Plant Soil* 204: 57-67.

## References bibliographiques

13. **Antoun.H., Bordeleaul.L. M., Gagnon.C. et R. A. Lachance. (1978)** : Effet du dextrose et de l'extrait de levure sur l'interaction entre deux espèces de *Rhizobium* et quelques champignons. *Phytoprotection* 5 9, 558-562.
14. **Arfaoui, A., Sifi B., Boudabous A., El Hadrami I. and Chérif M. (2006)** Identification Of *Rhizobium* Isolates Possessing Antagonistic Activity against *fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, the causal agent of fusarium wilt of chickpea *Journal of Plant Pathology*, 88 (1), 67-75.
15. **Arihara J. and Ohwaki Y. (1989)**: Estimation of available phosphorous in vertisol and alfisol on view of root effects on rhizosphere soil. In *XI Colloquium*. Wageningen, Holland.
16. **Arnaud. St .M., C. Hamel, M. Caron and Fortin. J.A. (1995)** : Endomycorhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies : synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. Pp. 51-87 in J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché (éds.), *La symbiose mycorhizienne. État des connaissances*. Éditions Orbis Publishing, relisghburg, Québec.
17. **Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Butler J. and Halliwell B. (1995)**: Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals. *Free Rad. Res.*22: 187 – 190.
18. **Atefeibu E.S.I., (2002)**: Contribution à l'étude des tannins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia nilotica var adansonii*. Thèse de doctorat d'état en pharmacie, University Cheikh Anta Diop de Dakar.15-16.
19. **Atik F., (1999)**: Etude des signaux chimiques impliqués dans la symbiose entre *Vicia faba* et *Rhizobium leguminosarum*. Thèse de doctorat, Univ. de Tlemcen. Algérie.
20. **Atkinson E. M., Palcic M. M, Hindsgaul O., and Long R S. (1994)**: Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity (nodulation/nod genes) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 8418-8422.
21. **Aufhammer W. (1998)**: Getreide- und andere Körnerfruchtarten. Stuttgart, Verlag Eugène Ulmer.pp.560.
22. **Aviram M. and Fuhrman B. (2003)**: Wine flavonoids, LDL cholesterol oxidation and atherosclerosis. In: **Sandler, M. and Pinder, R.** *Wine a scientific exploration*. Taylor and Francis. London. 140-160.
23. **Bahorun T., (1997)** : substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.83-84.

## References bibliographiques

24. **Bahorun T., Gressier B., Trotin F, Brunet C., Dine T, Luyckx M., Vasseur J., CazimM, Cazin J.C and Pinkas M.(1996)** : Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel- forschung/Drug Research*. 46 II (11): 1086 – 1089.
25. **Bahorun T., Trotin F., Pommery J., Vasseur J and Pinkas M. (1994)** : Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med.* 60: 323 – 328.
26. **Baldani J. I., Pot B., Kirchhof G., Falsen E., Baldani V. L. D., Olivares F. L., Hoste B., Kersters K., Hartmann A., Gillis M. and Döbereiner J. (1996)**: Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp, 46; 802-810.
27. **Barbour MW, Dennis T, Hatter Mann R, and Stacey GT. (1991)**: "Chemo taxis of *Bradyrhizobium japonicum* to Soybean Exudates." *Appl Environ Microbial.* Pp. 57 (9): 2635.
28. **Bardin. S.D., Huang H.C., Pinto. J., Amundsen and E.J., Erickson R.S. (2004)**: Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobiums. Une leguminosarum* bv. *Viceae*. *Can. J. Bot.* PP. 82; 291-296.
29. **Barker D. G., Journet E. P and Pingret J.L. (1998)**: *Rhizobium* Nod factor signalling; Evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell.* pp. 10; 659-672.
30. **Bauer P, Ratet P, Crespi MD, Schultze M. and Kondorosi A (1996)**: Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and *MsEnod12A* expression patterns in alfalfa roots. *Plant J* **10**: 91–105.
31. **Becker. J. O., Hedges. R. W. and E. Messens (1985)**: Inhibitory effects of Pseudobactine on the up take of iron by higher plants. *App. Environ. Mbobwl.*pp. 49, 1090-1093.
32. **Beijerinck M. W. (1888)**: Die Bacterien der Papilionaceenknöllchen. *Bot. Ztg.* pp. 46; 726-
33. **Belfontaine R. (1979)** : Vigueur de croissance du cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen) dans son aire naturelle et dans son aire d'introduction au Maroc. *Annales de recherche forestière au Maroc.* 19 ; pp 235-272.
34. **Ben Khaled L., Morte Gomez. A, Honrubia M., and Oihabi A. (2003)**: Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium* Characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant. Soil.* pp. 20; 383.

## References bibliographiques

35. **Berenbaum M.R.(1991): Coumarins in Herbivores** : Their interactions with secondary plant metabolites . Academic Press, New York.221-249.
36. **Berkum V. P., Beyene D., Bao G., Campbell T. A. and Eardly B. D. (1998):** *Rhizobium* mongolense sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol* .pp. 48; 13-22.
37. **Biaye M.,(2002):** Actions pharmacologiques des Tannins, thèse de doctorat d'état en pharmacie, University Cheikh Anta Diop de Dakar.3.
38. **Bidet D., Gagnault J.C., Girard P et Trotin F. (1987)** : Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 – 97.
39. **Bobak M. and Marmot M. (2003):** Wine and heart disease: a statistical approach. In: **Sandler M. and Pinder R.:** Wine a scientific exploration. Taylor and Francis. London. 92-107.
40. **Bohlool B. B. and Schmidt E. L. (1974):** Lectins a possible basis for speceficity in *Rhizobium* –legum roots nodule symbiosis *Science*. pp. 185; 269-271.
41. **Bond. D. A. (1976):** In vitro digestibility of the testa in tannin free field beans (*Vicia faba*). *J. Agric. Sci. (Camb)*. pp. 86; 561-566.
42. **Bond. D., Toynee-Clerke G., Pope M. and Hall J. A. (1986):** Comparaison between white and coulored flower plants and between near-isogenic tannin containing lines of *Vicia faba*. *Vortage für plansenzuchtung*. pp. 1; 137-150.
43. **Bordeleau, L. M. (1989) :** Potentiel du *Rhizobium* comme agent de lutte biologique. *Phymprotecron*. Pp. 70, 31-41.
44. **Bowen G. D. and Kennedy M. M. (1959):** Effet of high soil temperatures on *Rhizobium* spp. *Queensel. J. Agric. Sci* .pp. 16; 177-197.
45. **Brencic A. and Winans S.C. (2005):** Detection of and response to signals involved in host-microbe: interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 69:155-194.
46. **Brewin N. J. and Kardialsky I. V. (1997):** *Trends Plant Sci*. pp. 2; 92-98.
47. **Brisbane. P. G., Janik. J. J., Tate. M. E., and R. F. O. Warren (1987):** Revised Structure of the phenazine antibiotic from *Pseudomonas florescens* 2-79 (NRRL 15 132). *Antimicrob. Agents Chemolher*.pp. 31: 1967- 1971.

## References bibliographiques

48. **Brockwell, J., Gault RR., Zorin M., and Roberts M.J. (1982):** effects of environmental variables on the competition between inoculumstrains and naturalized populations of *R. trifolii* For nodulation of trifolium subterranean L. and on rhizobiapersistence in soil. Aust. J. Agric. Res. 33, 803-815.
49. **Brownlee H.E., Hedger J. and Scott I.M. (1992):** Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. Phys. Mol. Plant Pathol. 40 : 227 – 232.
50. **Brun N. (1991):** Les tannins de la féverole (*Vicia faba L., leguminosae*); diversité chimique et variétale. Thèse de doctorat d'Université. Université Claud Bernard. Lyon I. pp. 14-15.
51. **Brun N. and Chevalier F. (1987):** Tannins et plants destinées à la fabrication de tourteaux. Mémoire bibliographique de thèse.
52. **Bruneton J. (1993):** Pharmacognosie et photochimie. Plantes médicinales. Paris, France; Lavoisier .278-179.
53. **Bugnicourt M. (1995):** Dictionnaire de microbiologie général. La vie racontée par les bactéries. Faculté des Sciences de l'université de Picardie Jules Verne. Ellipses. 855.
54. **Burton J.C. (1979):** Microbial technology: *Rhizobium* species , Academie Press, Inc.29-58.
55. **Bushby H. V. A. (1982):** Ecology. In Nitrogen Fixation, Vol. 2: *Rhizobium*, W. J. Broughton (Ed), Clarendon Press Oxford. pp. 35-75.
56. **Buyer J. S, Sikora L. J. and Chaney R. L. (1989).** A new growth medium for the study of siderophore-mediated interactions. Biol. fert. Soils 8, 97- 10 1.
57. **Bwe. J., S. and J. Leong. (1986):** Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. 3. Biol. Chem. 261, 791-794.
58. **Cabrera A. and Martin A. (1986):** Variation in tannin content in *Vicia faba* L. J. Agric. Sci. Pp. 106; 377-382.
59. **Caetano-Anollés G., Crist-Estes D. K. and Bauer W. D. (1988):** Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J Bacteriol. Jul. **170** (7); 3164–3169.
60. **Casida J. L. E. (1982):** *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 32; 339-345.
61. **Chabot R., Antoun H., and Cescas M.P. (1996):** Growth promotion maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Plant Soil, **184**: 311–321.

## References bibliographiques

62. **Chakrabarti S. K. M., Lee and Gibson A. H. (1981):** Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. *Soil Biol. Biochem.* pp. 13; 349-354.
63. **Chakraborty. U and. Chakraborty. B. N (2006):** Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani f.sp. pisi* on pea affecting disease development and phytoalexin production. PP. 120-123.
64. **Chalk P. M. (1998):** Dynamic of biologically fixed N in legume. *Cereal rotation: a review, Aust. J. Res.* Pp. 49; 303-316.
65. **Charpy roubaud C., Charpy L. and Larkum A. W. (2001):** Atmospheric dinitrogen fixation by benthic communities of tike hau Lagoon (Tuamotu Archepelago, French Polynesia) and its contribution to benthic primary production *Mar. Biol.* pp. 139; 991-997.
66. **Chatagné G., (2007):** Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat, université Paul Sabatier, France.
67. **Chatel D. L. and Parker C. A. (1973):** Survival of field-grown rhizobia over the dry summer period in Western Australia. *Soil Biol. Biochem.* pp.5; 415-423.
68. **Chen H., Alan E., Richardson and Barry G. R. (1993):** Plant Microbe Interaction Group, Research School of Biological Sciences, Institute of Advanced Studies, Australian National University, GPO Box 475, Canberra City, *Appl. Environ Microbiol.* pp. 59(6); 1798-1804.
69. **Chen W. M., James E. K., Coenye T., Chou J. H., Barrios E., De Faria S. M., Elliott G. N., Sheu S. Y., Sprent J. I. and Vandamme P. (2006):** *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, pp. 56; 1847-1851.
70. **Chen W. M., Laevenus S., Lee T. M., Coenye T., Devos P., Mergeay M. and Vandamme P. (2001):** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic Fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp. 51; 1729-1735.
71. **Chen W. X., Han G. H. and 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.* pp. 38; 392-397.
72. **Chen W. X., Li G. S., Qi Y. L., Wang E. T., Yuan H. L. and Li J. L. (1991):** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, pp. 41, 275-280.
73. **Chen W. X., Tan Z. Y., Gao. J. L., Li Y. and Wang E. T. (1997):** *Rhizobium hainanense* sp. Nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 47; 870-873.

## References bibliographiques

74. **Chen W., Wang E., Wang S., Li Y., Chen X. and Li Y. (1995)** : Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 45; 153-159.
75. **Chen W.M., James E.K., Prescott A.R., Kierans M., and Sprent J.I. (2003)**: Nodulation of *Mimosa* spp by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 1051-1061.
76. **Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B.J. (2006)**: Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* Pp.124: 803-814.
77. **Chung K.T., Lu Z. and Chou M. W. (1998)**: Mechanism of inhibition of tannic and related compounds on the growth of initial bacteria. *Food and Chemical Toxicology.* 36, 1053-1060.
78. **Claude. B. and Thierry .H. (2007)** : BIOL3364 Principes et méthodes de la lutte biologique intégrée. pp.01.
79. **Clelia De-la-Pena, Lei Z.,. Watson B. S, Lloyd Sumner W. and Vivanco J. M. (2008)**: Root-Microbe Communication through Protein Secretion *JOURNAL OF Biological chemistry* 12, 2008•vol. 283•number 37.
80. **Cole M. A. and Elkan G.H.(1979)**: Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl. & environ. Microbiol.* vol.37 .No 5. pp. 867-870.
81. **Crofts H. J., Evans L. E. and Mc Vetty P. B. E. (1980)**: Inheritance, characterization and selection of tannins-*Faba beans*, *Can. J. Plant. Sci.* pp. 60; 1135-1140.
82. **Crow V. L., Jarvis B. D. W. and Greenwood R. M. (1981)**: Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing-strains of *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 31; 152-172.
83. **Crutzen P. J., Mosier A.R., Smith K.A., and Winiwarter W. (2007)**:N<sub>2</sub>O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **7**: 11191-11205.
84. **Cullimore J. V., Nieble A., Bono J. J., and Ranjeva R. (1997)**: Identification of a high affinity binding site for lipo-oligosaccharidic NodRm factors in the microsomal fraction of *Medicago* cell suspension cultures. *Mol. Plant Microb Interacts.* pp. 10; 132-134.
85. **Da Silva E. L., Piskula M. K., Yamamoto N. and Moon J.-H. (1998)** : Quercetin metabolites Inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Letters.* 430(3), 405-408.
86. **Dalpe. Y. and Monreal .M. (2004)**: Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. *Crop Manag.* PP; 301-309.

## References bibliographiques

87. **Das H.C, Wang J.H and Lien E.J. (1994):** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. 133 - 136. *In: Jucker E.* Progress in Drug Research. Basel: Birkhauser Verlag.
88. **David S., Fuhrmann., Hartel P. and Zuberer D. (1998)** principles and Applications of Soil Microbiology. pp 45; 120-132.
89. **Davies D.D., Giovanelli J., and Aprees T. (1964) :** Plant Biochemistry in **Brzowska J and Hanower P.(1976):** sur les composés phénoliques des végétaux et leurs rapport avec un déficit hydrique chez les cotonniers. Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences), tome XII.65-66.
90. **Dayan A.D., Campbell P.N. and Jukes T.H. (1988):** *Hazards of Biotechnology – Real or Imaginary.* Londres, Elsevier Applied Science. pp. 135.
91. **De Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M. D., Kersters K., Dreyfus B. and Gillis M. (1998):** *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp .nov. Nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 48; 1277-1290.
92. **De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M., Dreyfus B., Kersters K. and Gillis M., (1994):** Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. Nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 44; 715-733.
93. **De Ley J. and Russel A. (1965):** DNA base composition, flagellation and taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* pp. 41; 85-91.
94. **De Oliveira A. N.; de Oliveira L. A.; Andrade J. S.; Aloisio F. and Júnior C. (2007):** Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates *Braz. J. Microbiol.* vol.38 no.2 São Paulo Apr./June 2007.
95. **De Oliveira M.M, Sampaio M.R.P., Simon F., Gibert B and Mors WB.(1972) :**Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Acad. Brasil.* 44 : 41 – 44.
96. **Dénarié J., Debelle F and Promé J. C. (1996):** *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* pp. 65; 530-535.
97. **Dénarié J., Debelle F. and Rosenberg C. (1992):** Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* pp. 46; 497-531.

## References bibliographiques

98. **Deshwal. V.K., Dubey.R.C and Maheshwari.D.K. (2003)**: Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Current Sci.* PP.3; 443-448.
99. **Destremaux D. X. (1974)** : précision sur les aires naturelles des principaux confières marocaines en vue de l'individualisation de provenances. *Annales de recherche forestières au Maroc.* pp. 14 ; 1-90.
100. **Didry N., Pinkas M et Torck M. (1982)** : Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de divers espèces de grindelia. *Pl. Med. Phytother.* XVI: 7 - 15.
101. **Dixon R. O. D and C. T. Wheeler (1986)**: Nitrogen fixation in plants Blackie. Glasgow. Pp. 152.
102. **Dommergue S. Y., et Mangeno F (1970)** : Écologie microbienne du sol. Masson & Cie, Paris, 796.
103. **Dommergues Y., Duhaux E. and Hoang G. D. (1999)**: Les arbres fixateurs d'azote; caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Y. Dommergues (Ed). Edition espaces 34. Paris. pp. 47.
104. **Dreyfus B. L., Elmerich C. and Dommergues Y. R. (1983)**: Free-living *Rhizobium* strains able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 45; 711-713.
105. **Dreyfus B., Garcia J. L. et Gillis M. (1988)**: Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 38; 89-89.
106. **Dreyfus. B and Dommergues Y. R. (1981)**: Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS. Microbiol. Lett.* pp. 10; 313-317.
107. **Duc G. (1997)**: Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research.* Volume 53, Number 1, July. Elsevier. pp. 99-109(11).
108. **Duc G., Brun N., Mergham R. and Jay M. (1995)**: Genetic variation in tanning related characteristics in Faba bean seeds (*Vicia faba* L.) and their relationship with seed coat colour. *Plant Breed.* pp. 114; 272-274.
109. **Duhoux E et Nicole M. (2004)** : Biologie végétale : association et interaction chez les plantes. Dunod, Paris.
110. **Duke J. A. (1981)**: A handbook of legumes of world Economic importance plenum Press, New York.

## References bibliographiques

111. **Elad Y. and Chet I. (1987)**: possible role of competition for nutrients in biocontrol of pythium damping-off by bacteria. *Phytopathology*, 77: 190-195.
112. **El-Batanony M., Mazen M., Nadi Nadia H., Abd El-Monium M. M. and Massoud O.N. (2008)**: Cultural Filtrate of *Rhizobium* spp. and Arbuscular Mycorrhiza are Potential Biological Control Agents Against Root Rot Fungal Diseases of Faba Bean *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 3 (1): 32-41.
113. **Elkan G. H. (1967)**: Some effects of medium composition and metabolic intermediates on biotin inhibition in a strain of *Rhizobium japonicum*. *Can J. Microbiol.* pp. 13; 533-542.
114. **Elkan G. H. and Kurik I. (1968)**: Nitrogen, energy and vitamin nutrition of *Rhizobium japonicum*. *J. Appl Bacériol.* pp. 31; 399-404.
115. **El-mahalawy. A.A. (2004)**: The Rhizosphere yeast fungi as biocontrol agent for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporium*. *Int j. Agric.*
116. **Entrup L.N., et Oehmichen J. (2000)** : Lehrbuch des Pflanzenbaues. Band 2: Kulturpflanzen. Gelsenkirchen, Verlag Th. Mann. pp. 856.
117. **Ernst R. K., Yi E. C., Guo L., Lim K. B., Burns J. L., Hackett M. and Miller S. I. (1999)** .*Science* 286:1561–1565, pmid:10567263.
118. **Essalmani H et H. Lahlou. (2003)** : Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. *C. R. Biologies* 326. pp. 1163-1173.
119. **Essalmani H. et Lahlou H. :(2002)** : Cryptogamie. *Mycologie*, vol. 23, no3, pp. 221-234. ISSN 0181-1584.
120. **Esseling JJ, Lhuissier F.G.P; and Emons A.M.C (2003)**: Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982–1988.
121. **F.A.O. (1988)**: Programme de coopération technique. Programme de développement des productions fourragères et de l'élevage. Rapport de synthèse. pp. 45.
122. **Fargeix D. (2000)** : Étude des mécanismes d'oxydation des flavonoides en relation avec leur Activité antioxydant. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation Lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1.

## References bibliographiques

123. **Fellay R., Rochepeau P., Relic B., and Broughton WJ. (1995):** "Signals to and emanating from *Rhizobium* largely control symbiotic specificity", p. 199, in U. S. Singh, R. P. Singh., and K.Kohmoto;"Pathogenesis & host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases, vol. 1. Procaryotes". Pergamon/Elsevier Science Ltd., Oxford, United Kingdom.
124. **Finan T.M., Kunkel B., DeVos G.F., and Signer E.R. (1986):** Second symbiotic mega plasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exo polysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* Pp. 167: 66.
125. **Firmin J.L., Wilson K.E., Rossen L., and Johnston AWB. (1986):** Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature.* 324: 90–92.
126. **Fleishman. M., Eyale, Voisard.C. and Haas. D. (1990):** Suppression of Sept et Bitici by phenazine- or siderophore-deficient mutants of *Pseudomonas*. *Microbiol.* pp. 20 ; 121-124.
127. **Formica J. V. and Regelson W. (1995) :** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology.* 33(12), 1061-1080
128. **Fortmann M., (2000).** Das Grosse Kosmosbuch der Nützlinge. Neue Wege der biologischen Schädlingsbekämpfung. Stuttgart, Franckh-Kosmos Verlag.pp. 320
129. **Frank B. (1889):** Über die Pilzsymbiose der leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* pp. 7; 332-346.
130. **Frayse N, Jabbouri S, Treilhou M, and Couderc F, Poinot V. (2002):** Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides. *Glycobiology.* Pp. 12(11): 741.
131. **Fred E. B., Baldwin I. L. and McCoy E. (1932):** Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison.
132. **Gâbor M. (1988):** Plant flavonoïds in biology and medicine. *Biochemical Cellular and Medicinal properties*, eds. V. Cody.; E. Middleton.; Jr. J. B. Harborne.; A. Bertz.; A. R. Liss. Inc. New York. pp. 1-15.
133. **Gage D.J (2004):** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280–300.
134. **Gagne S. Antoun H. et Richard C. (1985):** Inhibition de champignons phytopathogènes par des bactéries isolées du sol et de la rhizosphère de Légumineuses; *Can. Journal of microbiology.* PP. 31(9): 856–860.

## References bibliographiques

135. **Gajendiran N and Mahadevan A.(1988)**: Utilisation of catechin by *Rhizobium sp.* Plant and Soil .108 :263-266.
136. **Gamas.P., De Carvalho-Niebel F., Lescure N. and Cullimore J.V. (1996)**: Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatulla* genres induced during nodule development. Mol.Plant.Microbe. Interacts.pp.4; 233-242.
137. **Gao J.L., Turner S.L., Kan F.L., Wang E.T., Tan Z.Y., Qiu Y.H., Gu J., Terefework Z., Young J.P.W., Lindström K. and Chen W.X. (2004.)**: *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from Astragalus adsurgens growing in the northern regions of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 54, 2003-2012.
138. **García-Fraile P., Rivas R., Willems A., Peix A., Martens M., Martínez-Molina E., Mateos P. F., and Velázquez E. (2007)**: *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 57; 844-848.
139. **Gardener W. K., Barbary D. G. and Barber D. A. (1981)**: Proteoid root morphology and function in *Lapinus albus*. Plant and soil. Pp. 60; 143-147.
140. **Garrett. S. D. (1965)**: Toward biological control of soil-borne plant pathogens. Dans Ecology of Soil-Borne plant pathogens: Prelude to biological control. Univ. California Press: Berkley, Ca. pp. 423-433.
141. **Gebhardt C., Turner G. L., Gibson A. H., Dreyfus B. L. and Bergerson F. J. (1984)**: Nitrogen- fixing growth in continuous culture of a strain of *Rhizobium* sp. isolated from stem-nodules on *Sesbania rostrata*. J. Gen. Microbiol. pp. 130; 843-846.
142. **Ghosh W. and Roy P. (2006)**: *Mesorhizobium thioganiceticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 56, 91-97.
143. **Giller K. E., McGrath S. P. and Hirsch P. R. (1989)**: absence of nitrogen fixation in clover grow on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only infective *Rhizobium*. Soil Biol. Biochem. pp. 21; 841-848.
144. **Gloss B. (2002)**: Valorisation des polyphénols en cosmétologie. In: polyphenols 2002.Recent advances in polyphenols research. XXI International Conference on Polyphenols .Marrakech-(Morocco), University Cadi Ayyad, Faculty of Sciences Semlalia.186-191.
145. **Glucksmann M.A., Reuber T.L., and Walker G. (1993)**: Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. J. Bacteriol. Pp. 175: 7045.

## References bibliographiques

146. **Gomez-Gomez L. and Boller T. (2002).** Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* pp. 7: 251-256.
147. **Götfert M. (1993):** Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol. Reviews.* pp. 104; 39-64.
148. **Gowen S.R., P. Quénehervé and R. Fogain. (2005):** Nematode Parasites of Bananas and Plantains. Pp. 611- 643 in *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2nd edition (M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds). CAB International, Wallingford, Royaume-Uni.
149. **Graham P, Sadowsky MJ, Keyser HH et al. (1991):** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41: 582-58
150. **Graham P. H and Parker C. A. (1964):** Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.* pp.20:383-396.
151. **Graham P. H. (1964a):** The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* pp. 35; 511-517.
152. **Graham P. H. (1964b):** Studies on the utilisation of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* pp. 30; 68-72.
153. **Graham P. H. (1969):** Analytical serology of the Rhizobiaceae In *Analytical serology of microorganisms*. Vol. 2. J. B. Kwapinski (ed). John Wiley and Sons, New York. p. 357-378.
154. **Guerinot, M. L., Meidl, E. J., and O.Plessner (1990):** Citrate as a sidérophores in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* Pp.172: 3298-3303.
155. **Guerinot. M. L. (1991):** Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. *Plant Soil* pp. 130; 199-209.
156. **Guinochet. M. et De Vilmorin. R. (1984):** Flore de France, Editions du CNRS. Paris.
157. **Guiulaumes J., Houdeau G., Germain. R and Ier J. M. (1998) :** INRA, Station de Pathologie, Route de St-Clément, Beaucouzé, 49000 Angers (France) INRA, Station de Recherches sur les Champignons, BP 131, 33140 Pont-de-la-Maye (France).
158. **Hagedorn C. (1979)** Relationship of Antibiotic Resistance to Effectiveness in *Rhizobium trifolii* Populations. *Soil Sci Soc Am J* 43:921-925.
159. **Haider K., Martin J.P., and Filip Z. (1975) :** Humus biochemistry In: **Paul E.A; McLaren A.D** :Soil Biochemistry. vol. 4. Marcel Dekker, New York. 195-244.

## References bibliographiques

160. **Hardy R.W.F.** and **Holsten R.D. (1972)**: The Aquatic Environment: Microbial Transformations and Water Quality Management Implications. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
161. **Hartwing U.A; Maxwell C.A; Joseph C.M; and Phillips D.A (1990)**: Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti* .Plant Physiology.92:116-122.
162. **Haslam E., Lilley T.H., Warminski E., Liao H., Cai Y., Martin R.,Gaffney S.H., Goulding P.N., and Luck G. (1992)**. Polyphenol complexation. In: Hoc T., Lee C.Y., Huang MT editors. Phenolic compounds in food and their effect on health.ACS Symposium Series. Washington: American Chemists Society. 8-50.
163. **Hayase F and Kato M. (1984)** :Antioxidant compounds of sweet potatoes. J. Nutri. Sci. Vitaminol.30: 37 – 46.
164. **Hellriegel H and Wilfarth N. (1888)**: Untersuchungen ueber die Stickstoffnahrung der gramineen und leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschrift des Verein Ruebenzucker- Industrie, Deutschen, Reichs.
165. **Helsper J. P. F. G., Van Norel Burger-Meyer K., and Koogendijk J. M. (1994)**: Effect of the absence of condensed tannins in faba beans (*Vicia faba*) on resistance to foot rot, *Ascochyta* blight and chocolate spot. J. Agric. Sci. Camb. pp. 123; 349-355.
166. **Heron D. S. and Pueppke S. G. (1984)**: Mode of infection, nodulation specificity and indigenous plasmids of 11 fast-growing *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. J. Bacteriol. pp. 160; 1061-1066.
167. **Heywood V. H. and Richardson I. B. K. (1964)**: The genera of flowering plants. Clarendon press, Oxford.
168. **Hollis A. B., Kloos W. E. and Elkan G. H. (1981)**: DNA: DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. J. Gen. Microbiol. pp. 123; 215-222.
169. **Holmes B., Popoff M., Kiredian M and Kersters K. (1988)**: *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group. Vd. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 38; 406-416.
170. **Hopper W and Mahadevan A. (2004)**: Utilisation of catechin and its metabolites by *Bradyrhizobium japonicum*. Applied Microbial and Cell Physiology.411-415.
171. **Hoshikawa K. (1990)**: Significance of legume crops in improving the productivity and stability of cropping systems. Paper presented at the international symposium on the use of stable isotopes in Plant Nutrition Soil fertility and Environment Studies. Vienna, Austria.

## References bibliographiques

172. **Hungria M., Chueire L. M. O., Coca R. G. and Megias M (2001)** Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol Biochem.* 33: 1349-1361.
173. **Hungria M., Joseph C.M and phillips D.A.(1991):** Anthocyanidins and flavonols, Major nod gene inducers from seeds of a Black-Seeded Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L).*Plant physiol.*97 :751-758.
174. **Infantin. A., Kharrat. M, L. Riccioni.L., Coyne.C.J. McPhee.K. Niklaus.J. And N.J. and Grunwald.N.J. (2006):** Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica.* PP. 147; 201-221.
175. **Iswaran V. Sundara Rao. W. V. B., Jauhri K. S. and Magu S. P. (1970):** Effect of temperature on survival of *Rhizobium japonicum* in soil and Mysore J. Agric. Sci. pp. 4; 105-107.
176. **Izallelen. M., (1997):** Production des sidérophores chez le rhizobium et leurs role dans l'inhibition de certains champignons phytopathogènes. Memoire de maitre ès sciences. Département des sols et de génie agro-alimentaire. Faculté des sciences de l'agréculture et de l'alimentation université Laval.
177. **Jagdish K L. and Rolando B SO (1994)** Numerical Taxonomy of photosynthetic rhizobial nodulating *Aeschynomene* Species. *International journal of systematic bacteriology* 44 (1): 62-73.
178. **Jain V., Garg N., and Nainawatee H.S. (1990):** Naringenin enhanced efficiency of *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 6: 434-436.
179. **Janczareck M, Urbanick-Sypniewska T., and Skorupska A. (1997):** Effect of authentic flavonoids and the exudate of clover roots on growth rate and inducing ability of nod genes of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol Res* .152, 93-98.
180. **Jarvis B. D. W., Pankhurst C. E. and Patel J. I. (1982):** *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 32; 378-380.
181. **Jarvis B.D.W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M, Fernandez M.P., Cleyet-Marel (J.C.) and Gillis M. (1997):** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 47, 895-898.
182. **Jensen H. L. and Schroeder M. (1965):** Urea and biuret as nitrogen sources for *Rhizobium spp.* *J. Appli. Bacteriol.* pp. 28; 473-478.

## References bibliographiques

183. **John M., Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., and Schell J. (1993):** *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase (nitrogen fraction/ lipooligosaccharide / Induction of protein refolding), *Biochemistry*, Vol. 90, pp. 625- 629 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
184. **Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006).** The plant immune system. *Nature*.pp. 444, 323-329.
185. **Jones. J. D. G., Grady. K. L., Suslow. T. V. and J. R. Bedbrook (1986).** Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO. J.* PP. 5; 467-473.
186. **Jonston, H. W. (1967).** Potential of the *Rhizobium-Fusarium* interactions on the incidence of *alfalfa* root rot. Ph.D. Thesis, University of Rhodes Island.
187. **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.* pp. 32; 136-139.
188. **Jordan D. C. (1984):** Family III. Rhizobiaceae. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. I.N.R. Krieg and J. G. Holt (eds). William and Wilkins Co., Baltimore, Md. pp. 234-244.
189. **Jourand P., Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B., and De Lajudie P. (2004):** *Methylobacterium* nodulans sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp.54; 2269-2273.
190. **Kaminski A. (1991):** Symbioses fixatrices d'azote *Rhizobium*-légumineuses. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* Pp. 6; 19-22.
191. **Kapulnik Y, Joseph CM, and Phillips DA. (1987).** Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiology*. 84 :1193–1196.
192. **Katteli H. (1994):** Une technique d'irrigation en profondeur pour le reboisement sur sols dunaires. *Secheresse* ; pp. 5 ; 25-50.
193. **Kaysi Y. and Melcion (1992):** Traitements technologiques de protéagineux pour le monogastrique, exemple d'application à la graine de féverole, INRA. *Prod. Anim.* 5(1). Pp. 3-17.
194. **Kempf. H.J. and G. Wolf (1989):** *Envinia crotowra* a biometric agent of *Fusarium culmonum* and *Puccinia recondite* f. sp. tritici on wheat. *Phytopathology*.pp.79: 990-994.

## References bibliographiques

195. **Keyser H. H., Bohlool B. B., Hu T. S., and Weber D. F. (1982):** Fast growing rhizobia isolated from roots nodules of soybeans. *Science*. pp. 215; 1631-1632.
196. **Khbaya., Neyra.M., et Filali-Maltou.A.F., (1995):** Etude de la diversité génétique d'une population naturelle de *Rhizobium* nodulant des Acacia du Maroc par analyse PCR/RFLP. Deuxième Colloque National sur les Plantes Forestiers. ENFI, Salé, Maroc.
197. **Kijne J W, Bauchrowitz M A. and Diaz C. L. (1997):** Root lectins and rhizobia. *Plant Physiol* .115, 869-873.
198. **Kijne J. W. (1992):** The *Rhizobium* infection process in biological Nitrogen Fixation (Stacey, G. Burris, R, H et Evans, H, J. Ed), Chapman and Hall Ltd. New York. pp. 349-398.
199. **Kinsella J. E., Frankel E. N., German J. B. and Kanner J. (1993):** Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant food. *Food Technology*.4, 785-789.
200. **Kirby Bauer, A.W., W.M.M., J.C. Sherris, and M. Turck. (1966):** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
201. **Kirk T.K., and Fenn P., (1982):** Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes. In: **Frankland J.C., Hedger J.N. and Swift M.J:** Decomposer basidiomycetes. Their biology and ecology. Cambridge University Press, London. 67-90.
202. **Kiss .E., Kereszt .A., Barta .F., Stephens .S., Reuhs .B.L., Kondorosi .A., and Putnoky .P.(2001):** The rkp-3 gene region of *Sino rhizobium meliloti* 41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure. *Mol Plant Microbe Interact.* Pp. 14(12): 1395.
203. **Kloepper. J. W., Leong. J., Teintze. M. and M. N. Schroth. (1980):** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting Rhizobacteria *Nature* (London).pp. 286; 885-886.
204. **Knösel D. H. (1984):** Genus *Phyllobacterium*. In: Krieg N.R and. Holt J.G (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, first edition, vol. 1, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp. 254-256. Validation list n° 15. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 34, 355-357.
205. **Kobayashi. Y., Tanaka. H. and O. Gasawara (1974):** Purification and properties of Fla, a p-glucanase which is highly lytic toward cell walls of *Piriculonaoryzae* E. *Agric.Biol. Chem.*pp. 3 8; 973-978.
206. **Kolodiej H. and Helspern J. P. F. G. (1993):** Proanthocyanidins from *Vicia faba* and their Trypsin Inhibitor Activity. *Planta Med.* 59, Suppl A689- A690.

## References bibliographiques

207. **Kosslak R.M., Joshi R.S., Bowen B.A., Paaren H.E., and Appelbaum E.R. (1990)**: Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. Applied and Environmental Microbiology. 56: 1333–1341.
208. **Kosslak, R. M., Bookland R., Barkei J., Paaren H., and Applbaum E. R. (1987)**: Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 84: 7428-7432.
209. **Kreofsky T., Schlager J.W., Vuk-Pavlovic Z, Abraham R.T and Rohrbach M.S. (1992)**: Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol. 7 : 172 – 181.
210. **Küçük Çi dem and Kıvanç Merih (2008)** Preliminary characterization of *Rhizobium* strains isolated from chickpea nodules. African Journal of Biotechnology 7(6): 772-775.
211. **Kundu S. and Hargrove M. S. (2003)**: Distal heme pocket regulation of ligand binding and stability in soy bean leghemoglobine. Proteine: structure, Functions and genetics. pp. 50; 239-248.
212. **Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., and Udell S.E. (1982)**. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can. J. Microbiol. (1992). pp. 38; 501-505. Validation list n° 45. Int. J. Syst. Bacteriol., 1993, 43, 398-399.
213. **Laguerre G., Nour S. M, Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. and Amarger N. (2001)**: Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts Microbiology 147 (2001), 981-993.
214. **Laird M., Lacey L.A. and Davidson E.W. (1990)**. Safety of microbial insecticides; Boca Raton, CRC Press, Inc. pp: 247.
215. **Lakhal A., Bensoltane A. and Atik F. (2009)**: Antimicrobial activity on phytopathogenic fungi by *Rhizobium* strains isolated from nodules on *Vicia faba* roots in west of Algeria. Egypt J. of Appl Sc 24 (10B): 432-446
216. **Lakhal A., Bensoltane A. and Atik F. (2008)**: Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from root of *Vicia faba*, multiple antibiotics resistance. Egypt J of Appl Sc 23 (12A): 62-73
217. **Lam. B. S., Strobel. G. A., Harrison. L. A. and Lam S. T. (1987)**: Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent *Pseudomonas*: Antimycotic production is Necessary for control of Dutch elm disease. hoc. Natl. Acad. Sci. USA. Pp. 84; 6447-6451.

## References bibliographiques

218. **Lamaze T., Khamis S., Foyer C., Farineau J., Valadier M. H and Morot- and Gaudy J. F. (1990):** Effet d'une limitation en N sur la photosynthèse chez le maïs. In. Physiologie et production du maïs. INRA. Paris. pp. 113-121.
219. **Lankford. C.E. (1973):** Bacterial assimilation of iron. C. d. Rev. Microbiol. pp. 2: 273-331.
220. **Larsen. J. et L. Bodker. (2001):** Interactions between pea root inhabiting fungi examined using signature fatty acids. New Phytol. Pp.149: 487-493.
221. **LaRue T. A and Patterson T. G. (1981):** How much nitrogen do legumes fix? Advan in Agronom. pp. 15; 34-38.
222. **Léger C.L., Carbonneau M. A. et Descomps B. (2000) :** Consommation de vin et prévention contre les maladies cardiovasculaires. In Alimentation méditerranéenne et santé: actualité et perspectives. Montrouge: Eurotext J. L. 81-97.
223. **LeRouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J. C and Denarié J. (1990):** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signals. Nature. pp. 344; 781-784.
224. **Lewin A., Rosenberg C., Meyer H., Wong C. H., Nelson. L., Manen J. F., Stanley J., Dowling D. N., Denarie J and Broughton W. J. (1987):** Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium sp.* NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. Plant Mol. Boil. pp. 8; 447.
225. **Leysen N. and Goffart P. (1977):** Biologie générale. Edition A. De Boeck, Bruxelles. pp. 65-66.
226. **Lian B., Zhou X., Miransari M., and Smith D.L. (2000) :** Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. J. Agron. Crop Sci. 185: 187-192.
227. **Lindström K. (1989):** *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 39; 365-367.
228. **Lindström K. and Martinez-Romero M. E. (2002):** International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Minutes of the meeting, 4 July 2001, Hamilton, Canada. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 52; 2337.
229. **Lindstrom.K. Vanb Erkum.P., Gillis.M. Martine.Z.E. Novikov. A.N. and Jarvis.B. (1995):** Report from the round table on *Rhizobium* taxonomy." In Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Tikhonovich, (N. A.) Provorov, (V. 1.) Romanov, (W. E.) Newton éd. Kluwer Academic Publishers. PP. 807-810.

## References bibliographiques

230. **Litterick A.M.** and **Watson C.A. (2003)**: Organic Farming. In Thomas B., Murphy D.J., Murray B.G: (2003). Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Londres, Elsevier Academic Press. Pp. 934-945.
231. **Liu. L., Kloepper. J. W.** and **S. Tuzun (1995)**: Induction of systemic resistance in *Cucumber* against *Fusarium* wilts by plant growth-promoting Rhizobacteria Phytopathology.pp. 85: 695-698.
232. **Lohnis F.**and **Hansen R. (1921)**: Nodule bacteria of leguminous plants *J.Agr.Res.*20:543-546.
233. **Long S.R.** and **Atkinson E. M. (1990)**: *Rhizobium* sweet-talking. *Nature* 344:712-713.
234. **Lugasi A, Hovari J; Sagi K.V;** and **Biol. (2003)**: The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta. Biol. Szeged.*47, 119-125.
235. **Maatallah J., El Bekkay B., Juan S.,** and **Carmen L., (2001)**: Phenotypic characterisation of rhizobia isolated from *chickpea* (*Cicer arietinum*) growing in M Moroccan soils. *Agronomie* 22 (2002). pp. 321-329.
236. **Mabry T.J** and **Ulubelen A. (1980)**: Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28 : 188 – 196.
237. **Macheix J.J; Fleuriet A;** et **Jay-Allemand C.(2005)** : Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique .Presses Polytechnique et universitaires Romandes .1,84,85,161.
238. **Macheix J.J; Fleuriet A .**and **Billot J. (1990)** : fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton.378.
239. **Madigan, MT, Martinko, JM & Parker, J.** and **Brock, (2000)**: Biologie des micro-organismes,9ed, Prentice-Hall, pp 709-717.
240. **Makkar N. S.** and **Casida Jr. L. E. (1987)**: *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 37; 323-326.
241. **Mandal S., Mandal M., Das A., Pati B** and **Ghosh A.(2009)** :Stimulation of indoleacetic acid production in a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* by root nodule phenolic acids.*Journal Archives of Microbiology* .389-393.
242. **Maria José. S, Vandillewijn P. Martinez-Abarka F., José I., Zurdo J.** and **Toro N. (2004)**: Attachement to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant *Alfalfa* nodulating bacteria *Rhizobium sp.* Lpu83. *FEMS. Microbiol. Ecol.* pp. 48; 71-7.

## References bibliographiques

243. **Marín D.H. (2005)**: Research in progress and future perspectives on the root system management (Abstract). Pp. 23 in Banana Root System: towards a better understanding for its productive management.
244. **Mars M., Aouani M. L., Jebara M., Ghrir R. et Ghoul M. (1992)**. Etudes du profil plasmidique, de résistance aux antibiotiques, insecticides et métaux lourds d'une collection de *Rhizobium* et de l'effet du zinc et du carbaryl sur leur association avec la vesce.
245. **Marshall. K. C. and M. Alexander (1960)**: Competition between soil bacteria and *Fusarium*, Plant et Soil. pp. 12; 143-153.
246. **Martenz M., Delaere M., Coopman R., De vos P., Gillis M., and Willems A. (2007)**: Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 57; 489-503.
247. **Martinez E., Romero D. and Placios R. (1990)**; The *Rhizobium* genom. Critical Reviews In Plant Sciences.9: 59-93
248. **Martinez. Romeo.O. Segoa.L., Merkant.F.E.M. Franco.A.A. Graham.P. and Prdo.M.A.(1991)**: *Rhizobium tropici*, a novel species nodulati *Phaseolus vulgaris* L beans and Leucaena sp trees. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 417-426.
249. **Martin-Tanguy J., Guillome J. and Kossa A. (1977)**: Condensed tannins of horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. J. Sci. Food Agric. pp. 28, 757-765.
250. **Masquelier J., Dumon M.C and Dumas J. (1979)**: Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. Acta thérapeutique. 1 : 101 – 104.
251. **Masterson R. V., Russel P. R. and Atheley A. G. (1982)**: Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum* J. Bacteriol. pp. 152, 928-931.
252. **Maxuell C. A and Philips D. A, (1990)**: Concurrent synthesis and relise of nod-gene inducing flavonoïdes from *alfalfa* roots. Plant Phisiol. Pp. 93; 1552-1558.
253. **Mengel K. and Kirkby E. A (1982)**: Nitrogen. "In Principles of plant nutrition: International Potash Institutue, K. Mengel., E. A. Kurkby eds. Worblalfen- Bern. pp. 335-328.
254. **Mercado-Blanco J. and Bakker P.A.H.M. (2007)**: Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas spp.*exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie Van Leeuwenhoek, 92, 367-389.
255. **Moënné-Loccoz Y., Nesme X. and Grundmann G. L. (2005)**: Development and validation of a prototype 16Sr RNA based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria. Environmental Microbiology.

## References bibliographiques

256. **Moez J., Aouani M. E., Mhamdi R., Ghir R. and Mohamed M., (2000)** Laboratoire de biochimie végétale et symbiotes (LAF 310), Institut national de recherche scientifique et technique, BP 95 - CP 2050 Hammam-lif, Tunisie. Volume 9, pp. 2, 99-102, Synthèse.
257. **Montesano M., Brader G. and Palva E.T. (2003):** Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* pp.4: 73-79.
258. **Moore.L.W. (1988):** Use of a *grobaflerizun radiobaccter* in agriculture ecosystems. *Microbiol. Sci. PP.* 5: 92-95.
259. **Moreira F. M. S., Cruz L., Faria S. M., Marsh T., Romero Martinez E., Pedro F. O., Pitard M. R and Young J. P. W. (2006):** *Azorhizobium doebereinae ps. Nov.* Microsymbiont de *Sesbania virgata* (caz) Pers. *Syst. Appl. Microbiol.* pp. 29 ; 197-206.
260. **Morot Gaudry.J.F. (1997):** assimilation de l'azote chez les plantes:aspect physiologique, biochimique, et moléculaire. INRA, Paris.
261. **Morris P, Bone E, and Tyler B. (1998):** Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol.* 117:1171-1178.
262. **Morsy K.M. and Tarrad A.M. (2005):** Effect of infection with *Botrytis fabae* and mechanical leaf defoliation on yield loss in faba bean. *Egypt. J. Appl. Sci.* 20.PP. 443-445.
263. **Mortimer J. C. , Laohavisit A., Macpherson N., Webb A., Brownlee C. Battey N. H. and Davies J.M. (2008):** Annexins: multifunctional components of growth and adaptation *Journal of Experimental Botany* Volume 59, Issue 3.
264. **Moulin L., Avarre J.C., Jaubert M., Barbe V., Béna G., Cartiaux F., Delajudie P., Dreyfus B., Elmerich D., Fardoux J., Hannibal L., Kojadinovic M., Lajus A., Mangenot S.G., Medigue C., Pignol D., Prin Y., Rouy Z., Stacey G., Sadowsky M., Vallenet D., Vermeglio A., Vuillet L., and Giraud E. (2006) :** Absence de gènes nod chez certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques révélée par l'analyse de la séquence de leurs génomes. In : SFP. 7èmes Rencontres plantes-bactéries, 20-23 mars 2006, Aussois, France. Résumés. Angers : INRA, p. 39. Rencontres plantes-bactéries. 7, 2006-03-20/2006-03-24, Aussois, France.
265. **Muthukumar G., Siivaramakrishnan and Mahadevan A. (1985):** Effects on tannins on plants and on their productivity. *Proceeding of the Indian National Science Academy.* B51, 1109-1118.
266. **Mylona P., Pawlowski K. and Bisseling T. (1995):** Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant. Cell.* pp. 7; 869-885.

## References bibliographiques

267. **Nagarajah S. A., Posner M. and Quirk J. P. (1970):** Competitive adsorption of phosphate with poly galacturonate and others organic anions on Kaolinite and oxid surfaces Nature. Vol. 288. pp. 83-84.
268. **Nakagawa Y., Sakane T. and Yokota A. (1996):** Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*", a gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 46; 16-22.
269. **Nasr H, Sghaier T., Ghorbal M. H. and Dommergues R Y (1999)** Variabilité génotypique de l'aptitude à la fixation symbiotique de l'azote chez *Acacia cyanophylla* Lindl. Can. J. Bot. 77(1): 77–86.
270. **Ndoye I. (1990):** Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Thèse de doctorat d'Université. Université des sciences et techniques de Lille. pp. 170.
271. **Negrila M., (2005):** Cercetari privind elaborarea unui sistem d'agricultura durabila pentru conditiile din Dobrogea. PhD Thesis. Bucarest, Université des sciences agronomiques et de médecine vétérinaire de Bucarest, Faculté d'agriculture. pp.286
272. **Nelson, E. B. and C. M. Craft. (1991):** Introduction and establishment of strains of *Enterobacter cloacae* in golf course turf for the biological control of dollar spot. Plant Dis. 75:510–514.
273. **Newton W. E. and Burgess B. K. (1983):** Nitrogen Fixation; its scope and importance. In nitrogen fixation. A. Müller.; W. E. Newton (Eds). Plenum Press. New York and London. pp. 1-19.
274. **Nick G., de Lajudie P., Eardly B.D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M., and Lindstrom K. (1999):** *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 49; 1359-1368.
275. **Niebel A.; Gressent F.; Bono J.-J.; Ranjeva R. and Cullimore J. (1999):** Recent advances in the study of Nod factor perception and signal transduction pp. 669-674(6).
276. **Niehaus K. and Becker A. (1998):** "The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium* legume interaction." Sub cell Biochem. Pp. 29: 73.
277. **Norrie P A. (2003):** The history of wine as a medicine. In: **Sandler M. and Pinder R.** Wine a scientific exploration. Taylor and Francis. London. 21-55.
278. **Norris N. O. (1965):** Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept. Plant and Soil. pp. 22; 143-166.

## References bibliographiques

279. **Nour S. M., Cleyet-Marel J. C., Normand P. and Fernandez M. P. (1995):** Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum L.*) and description of *Rhizobium mediterraneum sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 45, 640-648.
280. **Nour S. M., Fernandez M. P., Normand P. and Cleyet-Marel J. C. (1994):** *Rhizobium ciceri sp. nov.*, consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum L.*). Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 44, 511-522.
281. **Novak K, Kropacova M, Havlicek V, and Skrdleta V. (1995):** Isoflavonoid phytoalexin pisatin is not recognized by the flavonoid receptor NodD of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Folia Microbiologica. 40: 535–540.
282. **Novak K., Chavanec P., Skrdleta V., Kropacova M., Lisa L., and Nemcova M. (2002):** Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum L.*): Journal of Experimental Botany, Vol. 375: 1735-1745.
283. **Nozzolillo C., Ricciardi L. and Lattanzio V. (1989):** Flavonoids constituents of seed coat of *Vicia faba* (Fabaceae) in relation to genetic control of their color, Can. J. bot. pp. 67; 1600-1604.
284. **Nurnberger T. and Lipka V. (2005):** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Mol. Plant Pathol. pp. 6; 335-345.
285. **Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M and Takahara Y. (1993):** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata* *Phytochem.* 33: 557 – 561.
286. **Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H and Arichi S. (1983):** Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs; Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. Chem. Pharm. Bull. 31: 1625 – 1631.
287. **Oldroyd G. (2001):** Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. Annals of Botany. 87: 709-718.
288. **Ongena M. and Thonart P. (2006):** Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1st ed. Japan: Global Science Books. pp. 447-463.
289. **Ongena M. et al., (2007):** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbial. pp.9:1084-1090.
290. **Osmond M., Miouel M, Robin P., Conejer O. G., Domenac A. H. M. and Bardin R. (1980):** Influence du déficit hydrique sur l'activité nitrate réductase et nitrogénase chez le soja (*Glycine max L Merr.* cv Hodgson).

## References bibliographiques

291. **Ozkoc, I., and Deliveli, M. H. (2001):** In vitro inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli isolates. *Turk J. Biol.* 25:435-445
292. **Pan B., and Smith D.L. (2000):** Preincubation of *B. japonicum* cells with genistein reduces the inhibitory effects of mineral nitrogen on soybean nodulation and nitrogen fixation under field conditions. *Plant and Soil* .223: 235–242.
293. **Pankhurst C.E; and Jones W.T.(1979) :** Effectiveness of lotus root nodules. III.Effect of combined nitrogen on nodule effectiveness and flavolan synthesis in plant root.*J.Exp bot.* 30(119), 1109-1118.
294. **Pankhurst, C. E., and D. R. Biggs. (1980).** Sensitivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. *Can. J. Microbiol.* 26:542-545.
295. **Patt t E., Cole G. C. and Hanson R. S. (1976):** *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int.J. Syst.Bacteriol.* pp. 26, 226-229.
296. **Peoples M. P., Heridge D. F., and Ladha J. K. (1995):** Biological nitrogen fixation an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil.* pp. 3-28; 174.
297. **Perret X., Staehelin C. and Broughton W.J. (2000):** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* .64: 180-201.
298. **Persello-Cartieaux F., Nussaume L. and Robaglia C. (2003):** Tales from the nderground: molecular plant rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* pp. 26: 189-199.
299. **Peters N.K; and Long S.R.(1988):** Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes .*Plant Physiol.*88:396-400.
300. **Peters N.K; Frost J.W; and Long S.R (1986):** A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizbium meliloti* nodulation genes, *Science* 233:977-980.
301. **Phillips D. A. (1992):** Flavonoïdes: plant signals to soil microbes. *Recent Adv. Phytochem.* pp. 26 ; 201-231. *Physiologie et production du maïs.* INRA. Paris. pp. 113-121.
302. **Picard J. (1976):** Aperçu sur l'héridité du caractère absence de tannins dans les graines de féverole, *Ann. Amélior. Plantes.* pp. 26; 101-106
303. **Pollack, J. R., Ames, B. N and Neilands J. B. (1970):** Iron transport in *Salmonella typhimrim*, mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin. *J. Bacteriol.* Pp.104: 635-639.

## References bibliographiques

304. **Pontarier R., M'hiri A., Aronson J., Akrimi N.; et Le Flock E. (1995):** L'homme peut il refaire ce qu'il a déjà fait. Edition John Libbey Eurotext. Paris. pp. 455.
305. **Postgate (1974):** Evolution within nitrogen- fixing systems Symposia of the society for General Microbiology. pp. 24; 263-292.
306. **Prakash R. K. and Atherly A. G. (1986):** Plasmide of *Rhizobium* and their role in symbiotic nitrogen fixation. Int. Rev. Cytol. pp. 104; 1-24.
307. **Prinsen E. , Chauvaux N. , Schmidt J. , John, M., Wiencke U., DE Creel J. , Schell J., and Vano nckelen H. (1991).** Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Letters* 282, 53-55.
308. **Promé J.C et Demont N. (1993):** les oligosaccharides, des messagers chez les plantes. Biofutur. 25-58.
309. **Psotova J; Lavovsky J. and Vicar J. (2003):** Metal chelating propertides, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. Biomed. Papers. 153.
310. **Quan Z. X., Bae H. S., Baek J. H., Chen W. F., Im. W. T., and Lee S. T., (2005):** *Rhizobium daejeonense* sp. Nov., isolated from a cyanide treatment bioreactor. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 55; 2543-2549.
311. **Radu O L; Armand S; Lenouvel F; Driguez H; et Iordachescu D. (2006):** évaluation de l'activité de transglycosylation de la cyclodextrine glycosyltransferase de *Bacillus circulans* sur l'héspéridine en milieu de solvants organiques. Romanian J. Biophys; Vol . 16 , No .1 . Bucharest .1-2.
312. **Raga Rao v., Subba Rao N.S., and Mukerji K.C., (1973):** inhibition of *Rhizobium* in vitro by non nodulating legume root and root extracts. Plant and soil. 39, 449-452.
313. **Rao J.R and Cooper J.E. (1994):** *Rhizobium* catabolizes nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. Department of applied Plant Science .17: 5409-5410.
314. **Rao J.R., Sharma N.D., Hamilton J.T.G., Boyd D.R and Cooper J.E. (1991):** Biotransformation of the pentahydroxy-flavone quercetin by *Rhizobium* Loti and *Bradyrhizobium* strains (Lotus). Appl. Environ . Microbiol. 57:1563-1565.
315. **Raupach.G.S. and Kloepper.J.W. (1998):** Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathol. PP. 88; 1158-1164
316. **Ravn H., Andary C. , Kovacs G and Molgaard P. (1984) :** Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. Biochem. Syst. Ecol. 17:175 – 184.

## References bibliographiques

317. **Raza S., Jürnsgard B., Abou-Taleb H., and Christiansen J. L., (2001)** Tolerance of *Bradyrhizobium sp. (Lupini)* strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics Letters in Applied Microbiology. pp. 32; 379-383.
318. **Recourt K., Schripsema J., Kijne J.W., Van Brussel A.A.N., and Lugtenberg B.J.J. (1991):** Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. Plant Molecular Biology. 16: 841–852.
319. **Recourt K., Van Brussel A.A.N., Driessen A.J.M and Lugtenberg Ben J.J. (1989):** Accumulation of a *nod* gene inducer, the flavonoid naringenin, in cytoplasmic membrane of *Rhizobium Leguminosarum Biovar viciae* is caused by the PH-dependent hydrophobicity of naringenin. Journal bacteriology .171:4370-4377.
320. **Reddy N. R., Pierson M. D., Sathe S. K. and Salunke D. K.(1985):** Dry been tannins: a review of nutritional implication. J. Am. Oil. Chem. Soc. pp. 62; 541-549.
321. **Redmont J. W., Batley M., Djordjevic M. A., Innes R. W., Kuempt P. L., and Rolfe B. G. (1986):** Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. Nature (London). pp. 323; 632-635.
322. **Reuhs B.L., Carlson R.W., and Kim J.S. (1993):** *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. J. Bacterial. Pp.175 (11): 3570.
323. **Ribereau H. (1968):** les composés phénoliques des végétaux .Dunod, Paris.254.
324. **Rice-Evans C. A; Miller N. J. and Paganga G. (1996):** Structure-antioxidant activity Relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20, (7), 933-956.
325. **Rigaud J. (1965):** contribution à l'étude d'un milieu synthétique pour la croissance de *Rhizobium*.Ann Inst. Pasteur. pp. 109; 272-279.
326. **Rioux. C. R., Jordan. D. C. and Raitray J. B. M. (1986):** Iron requirement of *Rhizobium leguminosarum* and secretion of anthracitic acid during growth on an iondeficient medium. Arch. Biochem. Biophys.pp. 248; 175- 182.
327. **Rivas R., Willems A., palomo J. L.,García-Benavides P., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Gillis M., and Velázquez (2004):** *Bradyrhizobium betae sp. nov.*, isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 54; 1271-1275.

## References bibliographiques

328. **Rivas R., Willems A., Subba-rao N.S., Mateos P.F., Dazzo F.B., Kroppenstedt R.M., Martínez-Molina E., Gillis M. and Velázquez E. (2003):** Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. That nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. Syst. Appl. Microbiol., Pp., 26, 47-53. Validation list n° 92. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003, 53.PP. 935-937.
329. **Roberts G. P., Leps W. T., Silver L. E. and Brill W. J. (1980):** Use of two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. pp. 39; 414-422.
330. **Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., et al. (1991).** Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. Cell 67: 1131– 1143.
331. **Rodriguez-Navarro D N, Buendia A M, Camacho M, Lukas M M, and Santamatria C (2000):** Characterization of *Rhizobium* spp. Bean isolates from South West Spain. Soil Biol Biochem 32: 1601-161.
332. **Rolfe. B.G. and Gresshoff. P.M. (1988):** Genetic analysis of legume nodule initiation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology .pp.39: 297-319.
333. **Rome S., Fernandez M. P., Brunel B., Normand P. and Cleyet-Marel J. C. (1996):** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual Medicago spp. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 46, 972-980.
334. **Rosenberger C. M. , Gallo R. L., and . Finlay B. B. (2004):** Interplay between antibacterial effectors: A macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication; PNAS, vol. 101 no. 8 2422-2427.
335. **Roughley R. J., Wahab, F. A. and Sundram J. (1992):** intrinsic resistance to streptomycin and spectinomycin among root-nodule bacteria from Malaysian soils. Soil biol Biochem 24(7): 715-716.
336. **Sadowsky M. J., Cregan P. B., Gottfert M., Sharma A., Gerhold D.,Rodriguez-Quinones F., Keyser H. H., Hennecke H. and Stacey G. (1983):** The *Bradyrhizobium japonicum* nod A gene and its involvement in the genotype specific nodulation of soybeans. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. pp. 88; 637-641.
337. **Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S. and Yamaji N. (1998):** Antiulcer activity of grape seed extracts procyanidins. J. Agric. and F. Chem. 46(4): 1460-1464.
338. **Salducci X. (1992):** Activation des genes de nodulation de *Bradyrhizobium japonicum* par des composés isoflavoniques de synthèse, relation entre activité métabolique bactérienne et infectivité.

## References bibliographiques

339. **Salmond G. P.** and **Welch M.** (2008): Antibiotic resistance: adaptive evolution. *Lancet*.372, S97-S103.
340. **Salunkhe D. K., Chavan J. K.** and **Kaddam. S. S.** (1990): *Dietary Tannins: Consequences and Remedies*. CRC Press. Inc.Boca Raton. FL.
341. **Sawada H., Kuykendall L.D.,** and **Young J.M.** (2003): Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 155-179.
342. **Sawada.A.H, Ieki.H, Oyaizu.H.** and **Matsumoto.O.** (1993): Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Pp. 43: 694-702.
343. **Scalbert A.** and **Williamson G.** (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*.130, 2073-2085.
344. **Scheidle .H., Gross. A.** and **Niehaus .K.** (2005): The Lipid a substructure of the *Sino Rhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol.* Pp. 165(2) : 559.
345. **Schlaman HR, Okker RJ,** and **Lugtenberg BJJ.** (1992): Regulation of nodulation gene expression by Nod in Rhizobia." *J. Bacteriol.* Pp. 174: 5177.
346. **Scholla M. H.,** and **Elkan. G. H.** (1984): *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 34 ; 484-486.
347. **Scholla M. H., Moorefield J. A.** and **Elkan G. H.** (1984): Deoxyribonucleic acid homology between fast-growing soybeans-nodulating bacteria and other rhizobia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 34; 283-286.
348. **Schultze M.** and **Kondorosi A.,** (1996): The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J Microbiol Biotechnol.* 12: 47-137.
349. **Schwertmann. U.** and **Lindsay W. L.** (1983): Iron oxides. In *Minerals in soil environments*. J. B Dixon and S. B. Weed, eds. Soil Science society of America, Madison, WI. Pp.379-438.
350. **Schwinghamer E. A.** (1979): Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 33:121-136.
351. **Schwinghamer, E. A.,** and **Belkengren, R. P.** (1968): Inhibition of rhizobia by a strain of *Rhizobium trifolii*: some properties of the antibiotic and of the strain. *Arch. Mikrobiol.* 64:130-145.

## References bibliographiques

352. **Skot L., Timms, E. and Mytton R. (1994):** The effect of toxin-producing *Rhizobium* Strains, on larvae of *Sitonaflavescens* on legume mots and nodules. *Ph t & Soil* 1 6 3, 141-150.
353. **Segovia L., Young J. P. W. and Martinez-Romero E. (1993):** Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp .43; 374-377.
354. **Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. and Morozzi G. (2004):** Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 113-127.
355. **Sharma. S. and Dohroo N.P. (1996):** Vesicularar buscular mycorrhizae in plant health and disease management. *Intl. J. Trop. Plant Dis.* PP. 14 ; 147-55.
356. **Shemul-Haque and Ghaffar A. (1993):** Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, oh, soybean and rnungbean. *J. Phytopatho.*pp. 138: 157-163.
357. **Shishido M. and PEPPER I. L. (1990):** Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol Bioch* 22 (1):11-16.
358. **Siddiqui, I.A., Ehteham-ul-Haque S., Zaki M.J. and Ghaffar A. (2000).** Effect of urea on the efficiency of *Bradyrhizobium* sp., and *Trichoderma harzianum* in the control of root infecting fungi in mung bean and sunflower. *Sarhad J. Agric.*, 16(4): 403-406.
359. **Sietsma. J. A. and Wessels H. J. G. (1979):** Evidence of covalent linkages between chitin and fLglucan in a fungal wall. *J. Gen. Microbial.* pp. 114; 99-108.
360. **Simpfendorfer S., Harden T.J and Murray G.M. (2008):** *Australien Journal of Agricultural Research.* PP. 50 (8) 1469 – 1474.
361. **Sinclair M J. and Eaglesham A. R. J. (1984):** Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biol Biochem* 16 (3): 247-251.
362. **Singh, R., A. Adholeya and K.G. Mukerji. (2000):** Mycorrhiza in control of soil-borne pathogens. PP 173-196 in K.G. Mukerji, B.P. Chamola et J. Singh (éds.), *Mycorrhizal biology.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York .
363. **Singleton P. (2005):** *Bacteriologie pour la medecine, la biologie et les biotechnologies*, 6<sup>o</sup> édition.

## References bibliographiques

364. **Siqueira J.O., Nair M.G., Hammerschmidt R and Safu G.R. (1991):** Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 63-121.
365. **Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., and Krol J. (2006):** Rhizoidal exo polysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact.* Pp. 5-7.
366. **Skujin. J. J., Potgieter. J. and M. Alexander (1965):** Dissolution of funged cell wall by a Streptomyces chitinase and p-(13)-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* Pp.111, 300-364.
367. **Slattery J., Pearce D., Raynes M., Carpenter D., Dean G. and materne M.(2003) :** Variation in yield of faba bean across southern Australia following rhizobial inoculation, the Australian society of agronomy.
368. **Smitth. M.J., Shoolery. J. N., Schwyn. B., Holden. 1. and J. B. Neilands.(1985):** Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *J. Am.Chem. Soc.* pp. 107; 1739-1743.
369. **Spaink H .P. (1994):** The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.*65:81-98.
370. **Spaink, H. P., Wijffelman C. A., E. Pees, Okker R. H., and Lugtenberg B. J. J.. (1987):** *Rhizobium* nodulation gene nodD as a determinant of host specificity. *Nature* **328**:337–340.
371. **Squartini A., Struffi P., Döring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velázquez E., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S. and Nut. M. P. (2002):** *Rhizobium sullae* sp. Nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp. 52; 1267-1276.
372. **Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., and Soto, M.J. (2006):** Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141: 1473-1481.
373. **Stanier R. Y., Adelberg E. A. and Ingrahom J. (1976):** *The Microbial World*, pp 65 and 82. Prentice. Hall, New Jersey.
374. **Stavric B. and Matula T.I. (1992):** Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. 274–294 *In: Ong* Ash and Packer L: Lipid soluble and antioxidants. *Biochemistry and clinical applications.* Basel: Birkhauser Verlag.
375. **Steevenson J. F (1984):** *Humus Chemistry. Genesis. Composition. Reactions.* John wiley & sons. New York.
376. **Steevenson J. F. (1986):** *Cycles of soil, carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutriments.* John wiley & sons. New.York.

## References bibliographiques

377. **Stevanovic-Janesic T et Lemieux G. (2007)** : Étymologie et sémantique telles que proposées par le Groupe de Coordination sur le Bois Raméal lors du colloque sur les rémanents forestiers. Département des Sciences du Bois et de la Forêt Université Laval Québec.
378. **Stevez de Jensen C., Percich J.A. and Graham. H.P. (2002)**: The effect of *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* inoculation of dry bean seed on root rot severity and yield in Minnesota. Annu Rep Bean Improv Coop.PP. 45; 98-99.
379. **Stowers M. D. and Eaglesham R. R. (1984)**: A stem nodulating *Rhizobium* with physiological characteristics of both fast and slow growers. J. Gen. Microbiol. pp. 129; 3651-3655.
380. **Subba Rao, G. V. , N. Ae and T. Otani (1997)**: Genotypic variation in iron and aluminium-phosphate solubilizing activity of pigeonpea root exudates under P deficient conditions. Soil science and plante nutrition, 43(2), 295-305.
381. **Sun A. Y., Simonyi A. and Sun G. Y. (2002)**: The "French Paradox" and beyond; Neuroprotective effects of polyphenols. Free Radical Biology and Medicine. 32 (4), 314.
382. **Sun J; Khtan B; Huang S.H; Whiteman M and Zhu Y.Z. (2002)**: Effects on Eschemic Heart diseases and cardiovascular system.Acta.Pharmaco.23;1142-1150.
383. **Sutherland T. W. (1985)**: Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. Ann. Rev. Microbiol. pp. 39; 243-270.
384. **Sutherland T.D., Bassam B. J., Schuller L. J., and Gresshoff P.M. (1990)**: Early nodulation signals of the wild type and symbiotic mutants of soybean (*Glycine max*). Molecular Plant-Microbe Interaction. 3: 122-128.
385. **Swift M.J., Heal O.W., and Anderson J.M. (1979)**: Decomposition interrestrial ecosystems. Studies in ecology, volume 5, University of California Press, Bekerley. 372.
386. **Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., De Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. and Dreyfus B. (2001)**: *Methylophilic Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes Journal of bacteriology. pp. 183 (1); 214-220.
387. **Tan I K. P. and W. J. Broughtom (1981)**: Rhizobia in tropical legumes-XIV. Ion uptake differences between fast and slow growing strains. Soil Biol. Biochem. pp. 14; 295-299.
388. **Tan Z. Y., Kan F. L., Peng G. X., Wang E. T., Reinhold-Hurek B. and Chen W. X. (2001)**: *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 51, 909-914.

## References bibliographiques

389. **Terefework Z. (2002):** phylogenies *galegae*, and reflections on molecular evolution of *Rhizobium*-legume symbiosis." Academic Dissertation, April 2002 University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry.
390. **Thomas B., Murphy D.J., and Murray B.G. (2003):** Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Londres, Elsevier Academic Press. pp. 13-19.
391. **Tiwari R. P. R., Dilworth M. J. and Glenn A. R. (1998):** Can. J. Microbiol. pp.44 (6); 582-587.
392. **Toledo I., Lloret L. and Martínez-Romero E. (2003):** *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Syst. Appl. Microbiol. pp. 26, 54-64. Validation list n° 100. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. PP.54, 1909-1910.
393. **Tomas-Lorent F., Garcia-Grau F., M and Tomas-Barberan F. A. (1990):** Flavonoides from *Vicia faba* Seed exudates. Z. Naturforsch. 45c, 1070-1072.
394. **Truchet, G., Debellé, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Garnerone, A. M., Rosenberg, C., Batut, J., Maillet, F., and Dénarié, J. (1985):** Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. J. Bacteriol. 164:1200-1210.
395. **Trujillo M. E., Willems A., Abril A., Planchuelo A. M., Rivas R., Ludeña D., Mateos P. F., Martínez-Molina E. and Velázquez E. (2006):** Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. pp. 71, 1318-1327. Validation list n° 110. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006, 56, 1459-1460.
396. **Turgeon, B.G. and Bauer, W.D. (1985):** Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 163: 328-349.
397. **Turk.D. and Keyser.H.H. (1992):** Rhizobia that nodulate tree legume: specificity of the host for nodulation and effectiveness. Can. J. Microbiol. pp. 38: 451-460.
398. **Urban J. E. (1979):** Nondividing, bactéroïde-like *Rhizobium trifolii*: in vitro induction via nutrient enrichment. Appl. Environ. Microbiol. pp. 38; 1173-1178.
399. **Valentao P., Seabra R.M., Lopes G., Silva L.R., Martins V., Trujillo M.E., Velazquez E., and Andrade P.B. (2007).** Influence of *Dekkera Bruxellensis* on the contents of anthocyanins organic acid and volatile phenols of DAO red.
400. **Valverde A., Igual J. M., Peix A., Cervantes E. and Velázquez E. (2006):** *Rhizobium lusitanum* sp. nov., a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 56, 2631-2637.

## References bibliographiques

401. **Valverde A., Velázquez E., Fernández-Santos F., Vizcaíno N., Rivas R., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Igual J. M. and Willems A. (2005):** *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp. 55; 1985-1989.
402. **Valverde A., Velázquez E., Gutiérrez C., Cervantes E., Ventosa A. and Igual J. M. (2003):** *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp. 53, 1979-1983.
403. **Van berkum. P., Beyene.D. and Erdly.B.D. (1996):** Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species modulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.*pp.46:240-244.
404. **Van Brussel A.A.N., Recourt K., Pees E., Spaink H.P., Tak T., Wijffelman C.A., Kijne J.W. and Lugtenberg B.J.J. (1990):** A biovarspecific signal of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subs. *Nigra*. *J Bacteriol* 172: 5394-5401.
405. **Van der Meer I. M., Stuitje A. R. and Mol J. N. M. (1993):** Regulation of general phenylpropanoid and flavonoid gene expression In *Control of plant gene expression*. DPS Verma, eds. CRC Press. Boca Raton. pp. 125-155.
406. **Van Lenteren J.C., (2003):** Commercial Availability of Biological Control Agents. *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*. Wallingford, Oxon, CABI Publishing .pp. 167-179.
407. **Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. and interse C.M.J. (1998):** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*pp. 36: 453-483.
408. **Van Spronsen, P.C., Tak, T., Rood, A.M., van Brussel, A.A., Kijne, J.W., and Boot, K.J. (2003):** Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 83-91.
409. **Van Wees S.C.M. et al., (1997):** Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* Pp. 10: 716-724
410. **Vandamm.P.E. Pot. B., Gillis.M. Devos.P. Kerster.S.K. and Swings.J. (1996):** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*pp. 60: 407-438.
411. **Vandamme P., Goris J., Chen W. M., De Vos P. and Willems A. (2003):** *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* Pp. 25, 507-512. Validation list n° 91. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, 53, 627-628.

## References bibliographiques

412. **Velázquez E., Igual J. M., Willems A., Fernández M. P., Muñoz E., Mateos P. F., Abril A., Toro N., Normand P., Cervantes E., Gillis M. and Martínez-Molina E. (2001):** *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp. 51, 1011-1021.
413. **Velazquez E., Mateos P. F., Pedrero P., Dazzo F. B. and Martinez-Molina E. (2005):** Attenuation of Symbiotic effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 related to the presence of a cryptic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 61; 2033-3036.
414. **Vigin I., Neves L., Van Kammen A., Fraussen H. J and Bisseling. T, (1993):** *Science.* Pp. 260; 1761-1765.
415. **Vincent J. M. (1977):** *Rhizobium: General microbiology.* In *A Treatise on dinitrogen Fixation. Section III. Biology.* RWF Hardy, W.S. Silver (Eds). Wiley-Interscience, New York. pp. 277-366.
416. **Vincent J. M. (1970):** *A manual for a practical study of root nodule bacteria.* I. B. P, Handbook n° 15, Blackwell (Ed). Oxford. Edingborough. Pp. 164.
417. **Vinuesa P., León-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Pérez-Galdona R., Werner D. and Martínez-Romero E. (2005):** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteeae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium genospecies alpha* and *Bradyrhizobium genospecies beta*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp. 55; 569-575.
418. **Vriezen Jan A. C., de Bruijn Frans J., and Nüsslein K. (2007):** Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature *Appl Environ Microbiol.* 73(11): 3451–3459.
419. **Wang E. T., Rogel A., Garcia de los Santos A., Martinez Romero J., Cevallos M. A. and Martinez-Romero E. (1999):** *Rhizobium etli* bv *mimosa* a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bact.* pp. 49, 1479-1491.
420. **Wang E. T., Tan Z. Y., Willems A., Fernandez-López M., Reinhold-Hurek B. and Martínez-Romero E. (2002):** *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* pp; 52, 1687-1693.
421. **Wang E. T., Van Berkum P., Beyene D., Sui X. H., Dorado O., Chen W. X. and Martínez-Romero E. (1998):** *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 48; 687-699.

## References bibliographiques

422. **Wang F.Q., Wang E.T., Liu J., Chen Q., Sui X.H., Chen W.F. and Chen W.X (2007):** *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 57, 1192-1199
423. **Wang T.L., Wood E.A. and Brewin N.J. (1982):** Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas. Indole-3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strains of *R. leguminosarum*. Planta. 155: 343–349.
424. **Wani S. P., Rupela O. P. and Lee K. K. (1995):** Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant and soil. pp. 174; 29-49.
425. **Wei G. H., Wang E. T., Tan Z. Y., Zhu M. E. and Chen W. X. (2002):** *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp.52; 2231-2239.
426. **Wei G.H., Tan Z. Y., Zhu M. E., Wang E. T., Han S. Z. and Chen W. X. (2003):** Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp., 53, 1575-1583.
427. **Weller. D. M. (1988):** Biological control of soil borne plant pathogens in the bacteria Ann. Rev. Phytopathol. pp. 26: 379-407.
428. **Wendel, J. F., A. Schnubel, and T. Seelanan. (1995):** An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypoides* reveals ancient, cryptic intergenomic introgression. Molecular Phylogenetics and Evolution 4; 298: 313.
429. **Whipps, J.M. (2004):** Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Can. J. Bot. PP.82: 1198-1227.
430. **Wilkins J. (1967):** The effects of high temperatures on certain root – nodule bacteria. Aust. J. Agric. Res. pp.18; 299-304.
431. **Willems.A. and Collins.M. D. (1992):** Evidence for a close genealogical relation ship between *Afipia* the causal organism of cat scratch disease, *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*. FEMS Microbiol. Lett. pp.96: 241 -246.
432. **Willems.A. and Collins.M.D. (1993):** Phylogenetic analysis of rhizobia and agro bacteria based on 16s ribosomal DNA sequences. Int. J.Syst Bacteriol.pp. 43: 305-313.
433. **Wilson J. K. (1944):** Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. Soil Sci. pp. 58; 61-69.

## References bibliographiques

434. **Wittenberg J. B. and Wittenberg B. A. (2003):** Myoglobin, Function reassessed, the Journal of Experimental Bioogy. pp. 206; 2011-2020.
435. **Wolf A. B., Singleton P. W., Sidereli M. and Boohloul B. B. (1993):** Influence of acid soil on nodulation and interstrain competitiveness in relation tannin concentrations in seeds and roots of *Phaseolus vulgaris*. Soil. Biol. Biochem. pp. 25(6); 715-721.
436. **Xavier, L.J.C. and S.M. Boyetchko. (2002):** Arbuscular mycorrhizal fungi as biostimulants and bioprotectants of crops. Appl. Mycol. Biotechnol. pp. 2: 311-340.
437. **Xu L. M., Ge C. Cui Z., Li J. and Fan, H. (1995):** *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. pp. 45; 706-711.
438. **Yabuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T. and Arakawa M. (1993):** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol.pp. 36; 1251-1275. Validation list n° 45. Int. J. Syst. Bacteriol. (1993).PP:43; 398-399.
439. **Yanagi.M. et Yamasat.O.K. (1993):** Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16s rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol. Lett.pp. 107: 115-120.
440. **Yao Z. Y., Kan F. L., Wang E. T., Wei G. H. and Chen W. X. (2002):** Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus Lespedeza and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 52; 2219-2230.
441. **Younes M. (2001):** Inhibition de la symbiose rhizobium-légumineuses par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire de maître ès sciences (M. Sc.). Département de phytologie. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval. Canada
442. **Young C.C. and Chao C.C. (1989):** Intrinsic antibiotic resistance and competition in fast and slow-growing soybean rhizobia on a hybrid of Asian and US cultivars. Biol Fertil Soils 8:66–70.
443. **Young J. M. (2003):** The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 53; 2107-2110.

## References bibliographiques

444. **Young J. M., Kuykendall L. D., Martínez –Romero E., Kerr A. and 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.* pp. 51; 89-103.
445. **Young J. P. W. and Hauk K. E. (1996)**: Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* pp. 133:87-94.
446. **Young J. P. W. (1994)**: all those new names: an overview of the molecular phylogeny of plant associated bacteria." In *Advances in molecular genetics of plant microbe interactions*, M. J. Daniels, J. A. Downie, A. E. Osbourn éds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp.73-80.
447. **Zaat S.A. J., Wijffelman C.A., Mulders I.H.M., Van Brussel A.A.N., and Lugtenberg B.J.J. (1988)**: Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. *Plant Physiology*, 86, 1298–1303.
448. **Zaat S.A.J., Wijffelman C.A., Spink H.P., Van Brussel A.A.N., Okker R.J.H and Lugtenberg B.J.J. (1987)**: Induction of the nodA promoter of *Rhizobium leguminosarum* by plant flavanones and flavones. *J. Bacteriol.* 169:198-204.
449. **Zahran H. H., and Sprent J. L. (1986)**: Effect sodium chloride and polyethylene glycole root-hair infection and nodulation of *Vicia faba L.* by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*. pp. 167;303-309.
450. **Zakhia F, de Lajudie P. (2006)** : La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques application à la caractérisation des bactéries nodulants les légumineuses (BNL)." *Can. J. Microbiol.*
451. **Zhang F and Smith D. L. (1996)**: Inoculation of soybean (*Glycine max*) with genistein preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil and soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil*. 179: 233-241.
452. **Zhang F., and Smith D.L. (1995)**: Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiology* .108: 961–968
453. **Zilli J E, Valisheski R R, Freire Filho F R, Prata Neves M C, Rumjanek N G (2004)** Assessment of cowpea *Rhizobium* diversity in cerrato areas of north eastern Brazil. *Braz J Microbiol* 35(4): 281-287.
454. **Zryd J. P and Diogon T.(2003)**: Fixation de l'azote par les plantes.20 ème edition.

## References bibliographiques

455. Zurdo-Piñeiro J. L., Rivas R., Trujillo M. E., Vizcaíno N., Carrasco J. A., Chamber M., Palomares A., Mateos P. F., Martínez-Molina E. and Velázquez E. (2007): *Ochrobactrum cytisi* sp. nov. isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. pp. 57; 784-788.

### Webographie.

456. [www.artdepraslin.be/.../feves-cacao](http://www.artdepraslin.be/.../feves-cacao) 2005
457. [www.cea-technologies.com/article](http://www.cea-technologies.com/article). 2008.
458. [www.cnpab.embrapa.br/educacao/baby/rizobio](http://www.cnpab.embrapa.br/educacao/baby/rizobio).2002
459. [www.gerbeaud.com/.../06illustrations/feves](http://www.gerbeaud.com/.../06illustrations/feves) 2008
460. [www.idata.over-blog.com/.../34/fabacee/faverole](http://www.idata.over-blog.com/.../34/fabacee/faverole).2006
461. [www.jardiniersdetournefeuille.org](http://www.jardiniersdetournefeuille.org).2004
462. [www.legume-sec.com/Monde](http://www.legume-sec.com/Monde) .7 Avr 2006.
463. [www.olharfeliz.typepad.com/photos/uncategorized](http://www.olharfeliz.typepad.com/photos/uncategorized).2007
464. [www.prolea.com/index.php](http://www.prolea.com/index.php) 2008
465. [www.rdg.ac.uk/AcaDepts/sb/rhizobium](http://www.rdg.ac.uk/AcaDepts/sb/rhizobium).6 Jui 2006.
466. [www.afdlv.org/.../arachide/conaiss/SYara](http://www.afdlv.org/.../arachide/conaiss/SYara).1999.
467. [www.botany.hawaii.edu/.../index](http://www.botany.hawaii.edu/.../index) . 2008
468. [www.ncbi.nlm.nih.gov/.../](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../)1998
469. [www.ltab.asso.fr](http://www.ltab.asso.fr). 2009.
470. [www.jardinbrico.com](http://www.jardinbrico.com) . 2008.
471. [www.gepv.asso.fr](http://www.gepv.asso.fr). 2009.

# *Annexes*

**Annexe 1**

---

**champ de feve vicia faba dans la région de Tlemcen**





***Fleur de féverole de la région de Maghnia-Tlemcen- Algérie***



**Gousse de féverole cultivée dans la région de Maghnia**

**Tlemcen-Algérie**

### **LADICE : une féverole d'hiver combinant performances agronomiques et valeur nutritionnelle. Une collection de ressources génétiques originale maintenue à l'Inra de Dijon**

L'Inra de Dijon accueille l'une des collections de féveroles les plus importantes au niveau européen, par sa taille, et surtout par la qualité de son maintien (conduite en isolement pollinique) et la richesse de sa caractérisation. La collection concerne uniquement l'espèce cultivée *Vicia faba* L. Elle rassemble surtout des variétés traditionnelles pour la consommation animale en provenance de l'ensemble de l'aire de répartition. Elle regroupe les deux types de féveroles : hiver et printemps. Les matériels ont été introduits principalement entre 1950 et 1970 par prospections ou échanges entre laboratoires. Des matériels sud-américains (1980) et asiatiques (Chine en 1998) ont été ajoutés. Aujourd'hui la collection se compose principalement de matériels nord européens (75% dont 10 à 15% d'origine française). Une bonne complémentarité existe avec la banque espagnole (Cordoue) et l'ICARDA ("International Center for Agronomical Research in Dry Areas", Syrie) qui conservent surtout des fèves de consommation humaine adaptées à l'environnement méditerranéen. On estime actuellement le contenu de la collection INRA à 300 cultivars, 1500 populations fermières, 50 mutants. UMR Génétique et écophysiole des légumineuses – UMR-LEG (INRA-ENESAD) INRA Domaine d'Episses 21110 BRETENIÈRES 16 Janvier 2008

#### **Caractéristiques des féveroles d'hiver et de printemps.**

**Fiche technique (2004):** féverole biologique. Conseil régional ile de France

<b>Débouché</b>	<b>Variétés</b>
Alimentation des ruminants	Toutes variétés. Variétés classiques à fleurs colorées en particulier. <i>Printemps : Maya, Méli, Picadilly</i> <i>Hiver : Castel, Olan, Karl, Haw</i>
Porcs et volailles de chair	Variétés à fleurs blanches sans tanins (avec vicine-convicine). <i>Printemps : Gloria</i>
Alimentation humaine et pondeuses	Variétés à fleurs colorées sans vicine-convicine. <i>Printemps : Divine, Mélodie</i>
Oisellerie	Variétés à petites graines, sans tanins de préférence. <i>Printemps : Diana</i>

### Production de féverole:

Scrypetz (2007): (sarrasin / féveroles: situation et perspectives. bulletin d'agriculture et agroalimentaire. Canada vol.20 no .19.

<b>MONDE : PRODUCTION DE FÉVEROLES ET DE GROSSES FÈVES</b>					
	2003	2004	2005	2006	2007 <sup>ep</sup>
Superficies récoltées (kha)	2 755	2 885	2 680	2 809	2 600
Rendements moyens (t/ha)	1,86	1,84	1,87	1,97	1,88
	.....milliers de tonnes .....				
Chine	2 145	1 809	1 804	2 100	2 000
Royaume-Uni	664	661	716	613	344
Éthiopie	430	552	516	589	550
Égypte	337	330	282	315	320
France	291	373	397	325	272
Australie	305	182	359	121	180
Maroc	103	109	73	181	150
Soudan	171	173	112	138	130
Italie	60	82	87	85	98
Pérou	52	47	53	53	50
Tunisie	36	46	45	47	45
Iran	48	42	44	44	45
Allemagne	61	64	60	49	40
Espagne	57	60	41	49	45
Russie	26	41	33	38	35
Syrie	31	32	27	20	20
Algérie	31	32	27	24	25
Pologne	27	28	28	20	20
Canada*	8	15	10	16	17
Autres	<u>245</u>	<u>262</u>	<u>275</u>	<u>274</u>	<u>327</u>
<b>Total</b>	<b>5 126</b>	<b>4 940</b>	<b>4 989</b>	<b>5 115</b>	<b>4 650</b>
<sup>ep</sup> : estimations provisoires, AAC, décembre 2007					
Source : FAO, UNIP, Pulse Australia, Statistique Canada - décembre 2007					

## Localisation des poly phénols dans les fruits et légumes

La majorité des poly phénols se trouve localisée dans la peau et les graines des fruits, ainsi que dans les tiges .Cependant, cette distribution est moins nette dans les baies que dans les drupes (fruits à « noyau »): ainsi la pulpe de tomate contient-elle plus d'acides hydroxycinnamiques que la peau et le **tab**. Montre la distribution des différentes familles des flavonoïdes dans le règne végétal. Dans la cellule végétale, il existe deux sites principaux de localisation des poly phénols: La vacuole et la paroi cellulaire, cette dernière est plus ou moins riche en polyphénols selon la localisation de la cellule: les parties charnues du fruit sont pauvres (les poly phénols sont alors principalement contenus dans la vacuole), contrairement aux cellules dont la paroi a atteint le stade supérieur de rigidité (cellules de la peau et des pépins, épicarpes des grains de blé) (**Macheix et al., 1990**)

**Tab.06.**distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes  
(**Rice-Evans et al., 1996 ; Fargeix., 2000**)

Famille	Molécules principales	Distribution
flavone	apigénine, lutéoline, chrysin	pomme, céleri, grains de céréale,... (teneur = 5-100 mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), <i>Petroselinum sativum</i> , <i>Apium graveolens</i> ...
flavone	hespéridine, naringine, taxifoline	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg) <i>eucalyptus globulus</i>
flavonol	quercétine, myricétine et Kaempférol	pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin, olive, thé noir,... (teneur = 56-250 mg/kg)
isoflavones	génistéine et daidzéine	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg)
flavan-3-ols	(+)-catéchine, (-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg)
anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)

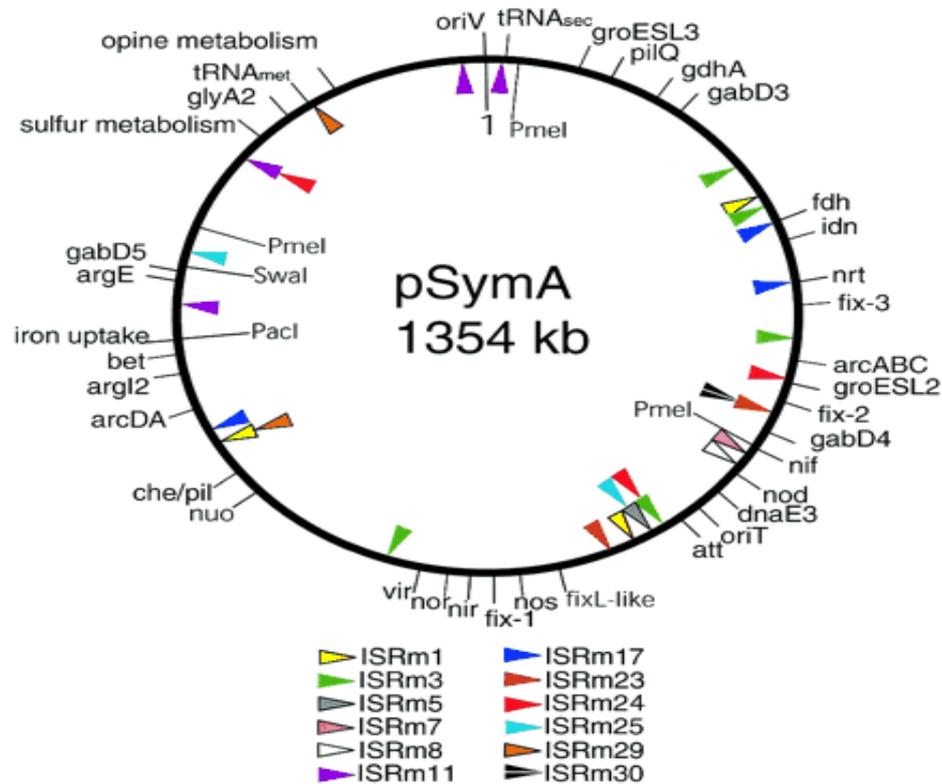
## Annexe 2

## Exemples de quelques espèces nodulant plus d'une plante

Genre espèces	Plantes hôtes	Référence
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia, Lens, Pisium</i>	<b>Jordan, 1984.</b>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<b>Martínez et al., 1991.</b>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	<b>Lindström, 1989.</b>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<b>Segovia et al., 1993.</b>
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	<b>Jordan, 1982.</b>
<i>B. elkanii</i>	<i>Arachis hypogaea, Glycine max</i>	<b>Kuykendall et al., 1993.</b>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<b>Dreyfus, 1988.</b>
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	<b>Rivas et al., 2003.</b>
<i>Methylobacterium nodulans</i>	<i>Crotalaria</i>	<b>Sy et al., 2001.</b>
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<b>Valverde et al., 2003.</b>
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Medicago, Trigonella, Melilotus</i>	<b>De Lajudie et al., 1994.</b>
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	<b>Moreira et al., 2006</b>
<i>Ensifer terangaie</i>	<i>Sesbania, Acacia</i>	<b>De Lajudie et al., 1994.</b>

### Nodulation and Nitrogen Fixation.

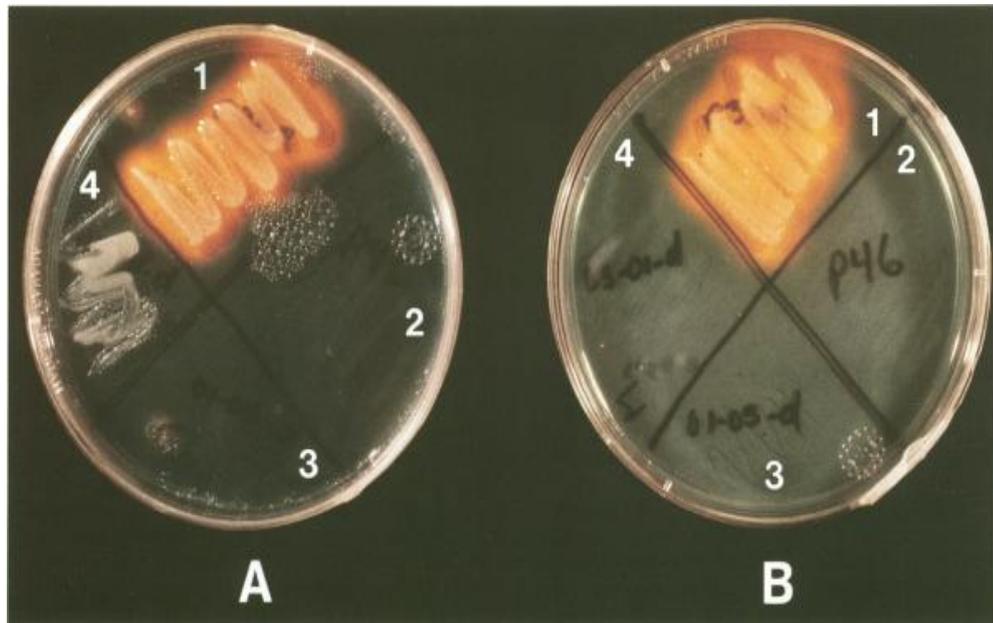
Nodulation (*nod*) genes encoding Nod factor biosynthetic enzymes and transcription activators are well characterized in *S. meliloti*



Map of pSymA. The position of the first nucleotide (denoted 1) was assigned adjacent to and clockwise from the *repABC* genes and putative origin of replication (6). Selected genes and regions mentioned in text are labeled. Locations of insertion sequence (IS) elements and IS fragments are marked with colored triangles. Putative chemotaxis genes (*che*), pilus assembly genes (*pil*), and NADH-ubiquinone dehydrogenase genes (*nuo*) are discussed in a concurrent publication (6). Sites of infrequently cutting restriction enzymes (*Swal*, *Pacl*, and *Pmel*) are marked. SMA designations for regions shown on the map are: *tRNA-sec*, SMA0011; *groESL3*, SMA0124–125; *pilQ*, SMA0163; *gdhA*, SMA0228; *gabD3*, SMA0260; *fdh*, SMA0478; *idn*, SMA0512–514; *nrt*, SMA0581–585; *fix-3*, SMA0612–622; *arcABC*, SMA0693–697; *groESL2*, SMA0744–745; *fix-2*, SMA0760–769; *gabD4*, SMA0805; *nif*, SMA0825–831; *nod*, SMA0840–878; *dnaE3*, SMA0892; *oriT*, SMA04018; *att*, SMA0950–958; *fixL-like*, SMA1142; *nos*, SMA1179–1188; *fix-1*, SMA107–1229; *nir*, SMA1247–1250; *nor*, SMA1269–1279; *vir*, SMA1302–1321; *nuo*, SMA1516–1536; *che/pil*, SMA1552–1578; *arcDA*, SMA1667–1670; *argl2*, SMA1711; *bet*, SMA1726–1731; iron uptake, SMA1740–1747; *argE*, SMA1836; *gabD5*, SMA1848; sulfur metabolism, SMA2067–2103; *glyA2*, SMA2135; *tRNA-met*, SMA2168; opine metabolism, SMA2223–2225; and *oriV*, SMA4019.

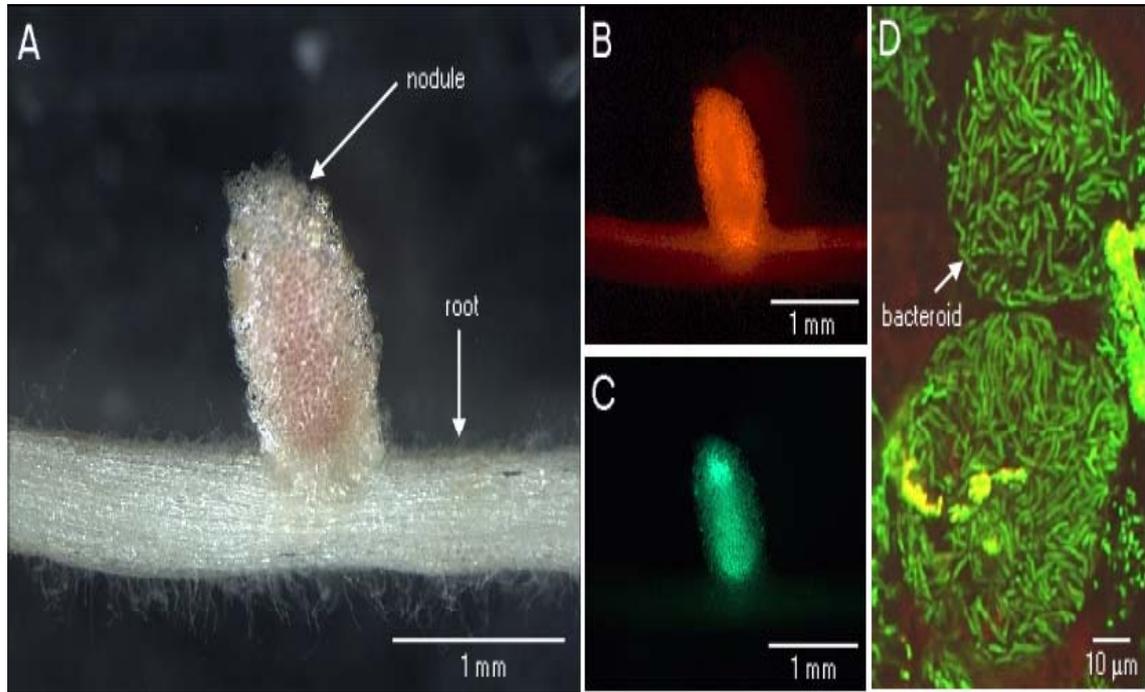
**Barnett et al., (2001):** Nucleotide sequence and predicted functions of entire *S. meliloti* pSymA Megaplasmid [www.pnas.org/cgi/10.1073/pnas.161294798](http://www.pnas.org/cgi/10.1073/pnas.161294798)

## Production de sidérophores



Response of *R. leguminosarum* *bv. trifolii* strains on CAS agar after 48 h with two carbon sources: fructose (A) and mannitol (B). Growth and large-halo production were evident for strain 162 P30d (smear 1). Strain P46 (smear 2) grew very slowly on CAS; although growth is not evident here, after several days moderate growth and small halos were present on both carbon sources. Strain 01-05-d (smear 3) produced no growth on either plate. Strain 03-01-d (smear 4) grew better on fructose than on mannitol, but no halos were produced. **AMES GOTTFRED et al., (1989):** Use of the Chrome Azurol S Agar Plate Technique to Differentiate Strains and Field Isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Applied and environmental microbiology, p. 707-710. vol. 55, No.3

### Formation des nodules et présence des bactéroïdes



Complementation of the B85 (*nsp1-1*) mutant with the NSP1 gene (A) Root nodule formed on a B85 mutant complemented with the NSP1 gene. The pink hue is caused by expression of Leghemoglobin indicating that the root nodule is functional and fixes atmospheric nitrogen. (B) Red fluorescence of the DsRED selection marker confirms the transgenic nature of the root and nodule. (C) Green fluorescence indicates that Sm2011-GFP infected the root nodule. (D) A root nodule section imaged using confocal microscopy. Two infected root nodule cells containing green fluorescent bacteroids show that Sm2011-GFP differentiates into its symbiotic form, indicating that the B85 mutant is fully complemented.

#### **Nod factor signaling and infection in *Rhizobium*-legume symbiosis**

Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands Smit, Patrick ISBN 978-90-8504-794-0

## Annexe 3

Préparation des solutions des glucides :

Glucides	Concentration limitée d'utilisation	Mode de stérilisation
Amidon	5%	115°C, 10 minutes.
Arabinose	30%	Filtration ou tyndallisation*.
Fructose	30%	Filtration.
Glucose	30%	110°C, 10 minutes.
Lactose	25%	Filtration ou tyndallisation*.
Maltose	30%	Filtration.
Mannitol	20%	110°C, 10 minutes.
Saccharose	30%	Filtration ou tyndallisation*.
Sorbitol	10%	110°C, 10 minutes.
Xylose	30%	Filtration.

Tyndallisation\* : 100°C pendant 30 minutes, 3 jours de suite.

- Le milieu Muller-Hinton

Infusion de viande de bœuf.....300 cm<sup>3</sup>.  
 Peptone de caséine.....17,5g.  
 Amidon du maïs.....1,5g.  
 Agar..... 7g.  
 Eau distillée.....100 ml.

Ajuster le pH à 7,4 avant autoclavage à 120° C pendant 15 minutes.

### Concentration minimales et supérieures d'inhibition des antibiotiques testés selon le comité français de l'antibiogramme (2000)

Antibiotiques	Sigle	Classe	CC inf.	d CC inf.	CC sup	dCC.sup
Acide naludixique	NA	Quinolones 1 <sup>er</sup> gén.	2µg. ml <sup>-1</sup>	22 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	15 mm
Acide pipemidique	PI	Quinolones 1 <sup>er</sup> gén.	8µg. ml <sup>-1</sup>	19 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	14 mm
Amikacine	AN	Aminosides	8µg. ml <sup>-1</sup>	17 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	15 mm
Amoxicilline	AMX	Amino pénicilline	4µg. ml <sup>-1</sup>	21 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	14 mm
Cefotaxine	CTX	Céphalosporines 3 <sup>o</sup> gén	4µg. ml <sup>-1</sup>	21 mm	32µg. ml <sup>-1</sup>	14 mm
Érythromycine	E	Macrolides	1µg. ml <sup>-1</sup>	32 mm	4µg. ml <sup>-1</sup>	17 mm
Gentamicine	GM	Aminosides	4µg. ml <sup>-1</sup>	16 mm	8µg. ml <sup>-1</sup>	14 mm
Kanamycine	K	Aminosides	8µg. ml <sup>-1</sup>	17 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	15 mm
Lincomycine	L	Macrolides lincosamides	2µg. ml <sup>-1</sup>	21 mm	8µg. ml <sup>-1</sup>	17 mm
Oxacilline	OX	Pénicilline M	2µg. ml <sup>-1</sup>	20 mm	2µg. ml <sup>-1</sup>	20 mm
Pénicilline G	P	Pénicilline G	0,25µg.ml <sup>-1</sup>	29 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	8 mm
Streptomycine	S	Aminosides	8µg. ml <sup>-1</sup>	15 mm	16µg. ml <sup>-1</sup>	13 mm
Tétracycline	TE	Tétracycline	4µg. ml <sup>-1</sup>	19 mm	8µg. ml <sup>-1</sup>	17 mm
Vancomycine	VA	Glycopeptides	-µg. ml <sup>-1</sup>	16 mm	-µg. ml <sup>-1</sup>	16 mm

Annexe 4

Résultats du métabolisme glucidique galerie biochimique classique



Représentation d'un nuage de points de l'ANOVA 2

