

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de Diplôme de Master Académique

Option : Biotechnologie Microbienne

THEME :

**CARACTERISATION DES BACTERIES NODULANTES DE QUELQUES
LEGUMINEUSES FOURRAGERES SPONTANEEES**

Présenté par :

M^{lle} IFREK Lydia Cherouk

M^{lle} RAMDANE Lamia

Devant le jury :

Présidente

Mme TAFIFET .L

M.C.B université Blida 1

Examinatrice

Mme BENKORTEBY.H

M.A.A université Blida 1

Promotrice

Mme BOUCHENAK.F

M.C.A université Blida 1

Co-promoteur

Mr CHADI. A

Doctorant U. Blida 1

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

A l'issue de ce travail réalisé au laboratoire de recherche de l'université de Blida , nous aimerions faire de ces lignes un signe particulier de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui nous ont apporté un soutien ou une contribution scientifique, logistique et/ou morale à ce modeste travail.

Nous tenons d'abord à remercier sincèrement notre promotrice **Mme Bouchenak F.** Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de nous encadrer et pour sa patience et disponibilité.

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, notre grand respect aux membres de jury :

*Notre président du jury **Mme TAFIFET .L** d'avoir accepté de juger notre travail ;

***Mme BENKORTEBY.H** d'avoir accepté d'examiner notre travail ;

Un grand merci et une sincère reconnaissance à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation durant nos études à l'Université de Blida.

Dédicace

Merci mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,

La force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve

Et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " Ya Karim "

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie,

Le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,

A ma mère ...

A mon père, école de mon enfance, A tous mes enseignants,

Particulièrement professeur Bouchenak .F que dieu les gardes et les protège.

A mes sœurs et mes frères : Faiza, Mahdi, Douàa et Walid

A ma chère binôme Lydia .

A tous ceux qui me sont chers, A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

LAMIA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à Mes très chers parents, Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, merci pour votre confiance, votre amour et votre encouragement, votre soutien inconditionnel dans les moments importants de ma vie qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs, que dieu vous protège.

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes chers frères et ma chère sœur pour qui je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

A toutes mes amies pour les bons moments passés ensemble.

A Ma binôme et sa famille.

A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fait de votre soutien infallible.

Merci d'avoir toujours été là pour moi.

LYDIA CHEROUK

CARACTERISATION DES BACTERIES NODULANTES DE QUELQUES LEGUMINEUSES FOURRAGERES SPONTANEEES

Résumé

Le présent travail porte sur l'isolement et la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioïdes*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum* poussant à l'état spontané. Nous avons choisi comme lieu d'échantillonnage la région de Blida dans le nord Algérien et les isollements ont été réalisés à partir de 102 nodules différents, afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique.

L'étude des caractères morphologiques et culturels et de la mobilité démontre que les bactéries isolées appartiennent au Rhizobia. La caractérisation phénotypique qui inclut des tests sur les différents milieux de cultures et la recherche des enzymes respiratoires montrent que les bactéries isolées à partir de l'espèce *Lotus Ornithopodioïdes* sont des *Rhizobium*, ou *Sinorhizobium*, ou *Mesorhizobium*. Le reste des isolats à croissance lente sont probablement du genre *Bradyrhizobium*, en particulier les bactéries isolées de l'espèce *Lotus edulis* ont donné une acidification sur le milieu GPA et une catalase négative, donc n'ont pas la même description que les Rhizobia.

Cette caractérisation reste quand même insuffisante, mais elle nous informe sur la position taxonomique hypothétique des isolats traités dans cette étude.

Mots clés: *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioïdes*, *Vicia sativa*, *Trifolium hybridum*, Rhizobia, phénotype, caractérisation, isolats, nodule.

CHARACTERIZATION OF NODULATING BACTERIA OF SOME SPONTANEOUS FORAGE LEGUMES

Abstract

This work focuses on the isolation and characterization of Rhizobacteria nodulating legumes *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioids*, *Vicia sativa* and *Trifolium hybridum* growing spontaneously. We chose the Blida region in northern Algeria as our sampling location and isolations were made from 102 different nodules, in order to assess and characterize the phenotypic diversity.

The study of morphological and cultural characters and mobility shows that the bacteria isolated belong to Rhizobia. The phenotypic characterization, which includes tests on different culture media and the search for respiratory enzymes, shows that the bacteria isolated from the species *Lotus Ornithopodioids* are *Rhizobium*, or *Sinorhizobium*, or *Mesorhizobium*. The rest of the slow growing isolates are probably from the genus *Bradyrhizobium*, in particular the bacteria isolated from the species *Lotus edulis* gave acidification on GPA medium and catalase negative, so do not have the same description as Rhizobia.

This characterization is still insufficient, but it informs us about the hypothetical taxonomic position of the isolates treated in this study.

Key words: *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioids*, *Vicia sativa*, *Trifolium hybridum*, Rhizobia, phenotype, characterization, isolates, nodule.

ملخص:

يركز هذا العمل على عزل و توصيف البقول الجذور العقدية لوتس ايدوليس.لوتس اورنيثوبوديويديس. فيشيا ساتيفا و تريفلويوم هجين التي تنمو تلقائيا. اخترنا منطقة البليدة في شمال الجزائر حيث تم اخذ العينات و عزلنا 102 عقدة مختلفة. من اجل تقييم وتمييز التنوع الظاهري. تظهر دراسة الخصائص المورفولوجية و الثقافية والتنقل ان البكتيريا المعزولة تنتمي الى **Rhizobia.**

يوضح توصيف النمط الظاهري. الذي يتضمن اختبارات على وسائط استنبات مختلفة والبحث عن انزيمات الجهاز التنفسي. ان **Mesorhizobium** او **Sinorhizobium** او **Rhizobium** هي **lotus ornithopodioids** البكتيريا المعزولة من نوع

Lotus ولا سيما البكتيريا المعزولة من نوع **Bradyrhizobium**. من المحتمل ان تكون بقية العزلات بطينة النمو من جنس **Rhizobia** و سلبي الكاتلاز. لذلك ليس لها نفس وصف **GPA** التي اعطت حمضا على وسيط

لا يزال هذا التوصيف غير كاف. لكنه يخبرنا عن الوضع التصنيفي الافتراضي للعزلات المعالجة في هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية. لوتس ايدوليس. لوتس اورنيثوبوديويديس. فيسيا ساتيفا. تريفلويوم هجين. ريزوبيا. النمط الظاهري. التوصيف. العزلات. العقيدات

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1. Rhizosphère, micro-organismes	4
1.1 Le Sol.....	4
1.2 La rhizosphère.....	4
1.3 L'impacte de rhizosphère sur les microorganismes et les plantes.....	6
2. Application des bactéries rhizosphérique dans les différents domaines de la biotechnologie microbienne	7
2. Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR)	8
2.1 GENERALITE.....	8
2.2 Modes d'action des PGPRs.....	10
2.2.1 Les modes d'action directs	11
2.2.2. Les modes d'action indirects des PGPR.....	13
3. Les légumineuses (macrosymbiotes)	14
3.1 GENERALITE.....	14
3.2 L'intérêt des légumineuses et leurs différentes utilisations.....	16
3.3 Notre modèle d'étude.....	18
3.3.1 Espèce <i>Lotus edulis L.</i>	19
3.3.2. Espèce <i>Lotus ornithopodioïdes L.</i>	19
3.3.3. Espèce <i>Vicia sativa L.</i> (La vesce commune).....	20
3.3.4. Espèce <i>Trifolium hybridum</i> (trèfle hybride).....	21
4. Bactéries nodulant les légumineuses (BNL)	23
4.1 Rhizobium (microsymbiote).....	23
4.1.1 GENERALITE.....	24
4.1.2 La classification et taxonomie.....	25
4.1.3 Les principales caractéristiques.....	26
4.1.4 Approches d'étude de la diversité des rhizobia	30
4.2 Mécanisme de fixation biologique d'azote chez les BNL.....	31
4.2.1 Les micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique.....	31
4.2.2 Fixation biologique de l'azote.....	33

4.2.3 Biochimie de Fixation.....	33
5. le processus de nodulation.....	36
5.1 La symbiose Rhizobium- légumineuses	36
5.2 Les nodosités.....	37
5.3 Structure de nodosité	37
5.4 Mode d'infection et développement des nodules	39
5.5 La génétique de nodulation	40
5.6 Les paramètres affectant la réussite de la nodulation	41
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	
1. Méthodes expérimentales	45
1.1 Matériels biologique.....	45
1.2 Position systématique des échantillons.....	46
1.3 Les légumineuses étudiées	47
1.4 Collecte des nodules	48
1.5 Conservation des nodules.....	49
1.6 Isolement des souches à partir des nodules.....	50
1.6.1 Stérilisation de nodules	50
1.6.2 Ecrasement des nodules	51
1.6.3 Isolement des souches.....	51
2. Caractères cultureux des isolats.....	52
2.1 Principaux milieux de culture utilisés	52
2.2 Purification des isolats.....	53
2.3 Examen morphologique des isolats.....	53
2.4 Examen microscopique (coloration de Gram.....	53
2.5 Examen de mobilité.....	54
3. Caractéristiques métaboliques des isolats.....	54
3.1 Vitesse de croissance	54
3.2 Test d'absorption du colorant rouge Congo sur milieu YEMA.....	55
3.3 Test de croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA).....	55
3.4 Etude des enzymes respiratoires.....	56
3.4.1 Recherche de la catalase	56
3.4.2. Recherche de l'oxydase: (Indophenol oxydase).....	56
4. Conservation des souches.....	57
Chapitre 3 : Résultats et discussions	
1. Caractéristiques des échantillons.....	59

2. Les isolats des nodules racinaires.....	61
3. Caractères morphologiques et culturels des isolats.....	62
3.1 Caractérisation culturelle	62
3.2 Temps de croissance	62
3.3 Croissance sur YMA+ RC	62
3.4 Croissance sur GPA+BCP.....	63
3.5 Résultat de la coloration de Gram.....	64
3.6 Examen de mobilité.....	65
4. Caractérisation métaboliques des isolats	66
4.1 Mesure de la vitesse de croissance	66
4.2 Caractérisation des enzymes respiratoires	67
4.2.1. Recherche de la catalase	67
4.2.2 Recherche d'oxydase	67

Conclusion générale et perspectives

Référence bibliographique

Annexes

Liste des abréviations

BNL: Bactéries Nodulant les légumineuses

NH₃: Azote ammoniacal

ACC: Carboxilate-1-aminicyclopropane

ISR: Indiced Systémique Résistance

AG: Acide gibbérellique

matK: La maturase chloroplastique K

CO₂ : Dioxyde de carbone

NaCl: Chlorure de sodium

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

NO: Oxyde nitrique.

NB₃: Ammoniac

NH₄: Ammonium.

N₀₃- : nitrate

BNF: La fixation biologique de l'azote

IAA : Acide indole-acétique

K : Potassium

N₂ : Nitrogène

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PH : Potentiel d'Hydrogène

P: phosphore

Pb: Paire de base

sp : species (espèce non déterminée)

KCl : Chlorure de potassium

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère.....	5
Figure 2 : Les mécanismes d'action des Rhizobactéries.....	12
Figure 3 : Espèce <i>Lotus edulis</i>	22
Figure 4 : Espèce <i>Lotus ornithopodioides L.</i>	23.
Figure 5 : Différentes parties d'une plante de vesce.....	24
Figure 6 : Schéma d'une fleur de Papilionacée avec ses éléments morphologiques.....	26
Figure 7 : Espèce <i>Trifolium hybridum</i>	29
Figure 8 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S.....	31
Figure 9 : Le processus biochimique de fixation de l'azote catalysé par les composants de la nitrogénase.....	43
Figure 10 : Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes.....	45
Figure 11 : Infection de légumineuses par les Rhizobia.....	48
Figure 12 : Localisation des sites d'échantillonnages.....	52
Figure 13 : Échantillonnages de nos espèces d'étude après la collecte.....	54
Figure 14 : Echantillon de nodules de l'espèce <i>Vicia sativa</i>	55
Figure 15 : Détachement des nodules du l'espèce <i>Ttifolium hibridum</i>	55
Figure 16 : Conservation des nodules.....	56
Figure 17 : Stérilisation des nodules.....	57
Figure 18 : Ecrasement des nodules à l'aide d'une pince stérilisée.....	57
Figure 19 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans.....	58
Figure 20 : Les milieux de culture utilisés dans notre étude.....	59
Figure 21 : Ecoulement les milieux de culture dans les boite de pétrie stérile.....	59
Figure 22 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans sur le milieu YMA+Bleu de Bromothymol.....	6
Figure 23 : Ensemencement des isolats par la technique des quatre cadrans sur le milieu Glucose Peptone Agar (GPA).....	62
Figure 24 : suspension bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée dans une lame stérile.....	63

Figure 25: Aspect de colonies sur les milieux de cultures. A: YMA+ RC ; B: YMA	70
Figure 26: Croissance sur GPA+BCP.....	70
Figure 27 : Résultat de la coloration de Gram des trois espèces.....	71
Figure 28 : Le milieu Mannitol mobilité avant l'ensemencement.....	72
Figure 29 : Mobilité des souches sur le milieu Mannitol mobilité.....	72
Figure 30 : résultats mesure vitesse de croissance.....	73
Figure 31 : les résultats du teste catalase.....	74
Figure 32 : les résultats du teste oxydase.....	78

Liste des tableaux

Tableaux n°1 : Quelques applications des bactéries rhizosphérique dans les différents domaines de la biotechnologie microbienne.....	7
Tableau n°2 Formes de PGPR et leur mécanisme d'action stimulant la croissance des plantes..	14
Tableau n°3 : Principales caractères distinctifs entre les rhizobiums à croissance rapide et lente.....	31
Tableau n°4 : Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote.....	34
Tableau N°5 : position systématique de l'échantillon 01.....	55
Tableau N°6 : Position systématique de l'échantillon 02.....	56
Tableau N°7 : Position systématique de l'échantillon 03.....	56
Tableau N°8 : Position systématique de l'échantillon 04.....	56
Tableau N°9 : Caractéristiques de <i>L. edulis</i> des sites d'échantillonnages.....	71
Tableau N°10 : Caractéristiques de <i>L. ornithopodioïdes</i> des sites d'échantillonnages.....	71
Tableau N°11 : Caractéristiques de <i>V. sativa</i> des sites d'échantillonnages.....	71.
Tableau N°12 : Caractéristiques de <i>T. hybridum</i> des sites d'échantillonnages.....	72
Tableau N°13 : Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses utilisées.....	72
Tableau N°14 : Résumé des caractères cultureux des dix (10) isolats après observation à l'œil	72
Tableau N°15 : Temps de croissance des souches isolées.....	73
Tableau N°16 : Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram.....	76
Tableau N°17 : Résultats d'absorption de RC ; croissance sur milieu GPA et acidification ou alcalinisation (BBT).....	79
Tableau N°18 : Résultats du test de la catalase et de l'oxydase pour les isolats des quatre espèces.....	81
Tableau N°19 : Caractéristiques cultureux des rhizobia isolats des 4 espèces fourragères.....	81

Introduction générale

Introduction

En tant que branche de la biotechnologie microbienne, la bactériologie est l'étude des bactéries. Cependant, la caractérisation des bactéries est complexe et loin d'être complète (**Rappé et Giovannoni, 2003**). Pour cela, des études complémentaires sont nécessaires sur les espèces identifiées. Par conséquent, la classification des bactéries est un long voyage, mais qui profitera considérablement à notre connaissance de l'ensemble de l'écosystème. Les bactéries peuvent être classées en utilisant un certain nombre de caractéristiques. Différents phénotypes morphologiques, physiologiques et métaboliques tels que la coloration de Gram, la capacité à utiliser diverses sources de carbone ou d'azote, la tolérance au stress environnemental et la pathogénicité des bactéries peuvent être appliqués pour la classification.

Les PGPRs, c'est des bactéries rhizosphériques bénéfiques qui ont été largement étudiées en raison de leur potentiel de productivité agricole (**Davranova et al., 2013**). Parmi les rôles majeurs attribués à l'action des PGPR, la protection contre les pathogènes, l'augmentation l'absorption des nutriments, l'amélioration des fonctions racinaires, de la germination et de la production des graines sont les plus notables (**Amir et al., 2005 ; Kenneth et al., 2019**).

Parmi les genres des PGPRs, on trouve «les *Rhizobia*». Ce mot en son strict sens faisait autrefois référence aux membres du genre *Rhizobium*. C'est pourquoi **Zakhia et al. (2004)** ont proposé le terme BNL (Bactéries Nodulant les légumineuses) pour éviter toute confusion entre le terme général de *Rhizobium* et le nom du genre. Ces *Rhizobia* sont des bactéries capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des légumineuses et de favoriser leur croissance dans les sols pauvres en azote (**Sprent, 2009**).

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les *Rhizobia* appartiennent toutes à la superfamille des Fabaceae (**Selami, 2015**). Elles forment la troisième famille par ordre d'importance chez les Angiospermes avec près de 20000 espèces. C'est l'une des familles les plus diversifiées du groupe des plantes supérieures dans leur morphologie, leur habitat et leur écologie. Elles comprennent des espèces ligneuses et des herbacées (**Diegane, 2018**). Ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agronomie car elles sont riches en protéines (haricot, pois, lentille, soja, trèfle, luzerne...), en agroforesterie (production de bois, huiles, résines...) et également dans la restauration des sols dégradés (**Yahara et al., 2013**).

Concernant les légumineuses spontanées, elles ont longtemps été considérées par les agriculteurs comme de simples mauvaises herbes. Mais actuellement, elles sont l'objet de plusieurs études. Grâce à leurs symbioses avec les *Rhizobiums* qui forment des nodules fixateurs d'azote sur leurs racines et parfois sur leurs tiges, elles jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, comme fourrage pour les animaux (**Bernard, 1996**). Ces espèces et leurs symbiontes ont attiré l'attention des écologistes en raison de leur tolérance aux conditions environnementales extrêmes, telles que la salinité, la sécheresse et les températures élevées (**Zahran, 2001 ; Moschetti et al., 2005**).

La fixation biologique de l'azote constitue l'un des processus majeurs de transformation de l'azote gazeux en une forme assimilable par les plantes (**Kaminski, 1991**). C'est un processus métabolique, réalisé par des bactéries nodulant légumineuses (BNL) possédant une enzyme appelée Nitrogénase. Cette enzyme permet de convertir l'azote de l'air (N₂) en azote minéral

intermédiaire (azote ammoniacal, NH₃) qui est alors assimilable par les organismes vivants pour constituer les molécules organiques (notamment les protéines) (**Schneider et al., 2015**).

Dans l'interaction Rhizobia-légumineuses, la plante hôte fournit des produits photosynthétiques en échange de l'ammoniac converti à partir de l'azote atmosphérique par les *Rhizobiums* (**Oldroyd et al., 2011**). Cet échange de nutriments bidirectionnel intime a lieu dans les cellules des organes racinaires appelés nodules. Le programme d'infection garantit que les *Rhizobia* sont guidés de la surface de la racine dans les cellules d'un primordium nodulaire en division en trois étapes conceptuelles: (i) croisement de l'épiderme; (ii) propagation corticale; et (iii) l'absorption de *Rhizobium* dans les cellules végétales. Cependant, cela est atteint différemment selon la légumineuse hôte (**Ibáñez et al., 2017**).

En Algérie, de nombreuses études sur la symbiose rhizobia-légumineuses sont réalisées (**Boulila et al. 2009 ; Merabet et al. 2006 ; Chafi et Bensoltane 2009 ; Amrani et al. 2010 ; Boukhatem et al. 2012 ; Riah et al. 2014 ; Ahnia et al. 2014 ; Torche et al. 2014 et autres**), ces études ont concerné les *Rhizobia* des différentes régions du pays (régions de nord, semi-aride et aride).

Nous nous sommes intéressées au cours de ce travail à l'identification et la caractérisation phénotypique des microsymbiotes nodulant des légumineuses: *Lotus ornithopodioïdes*, *Lotus edulis*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum* qui poussent spontanément dans la région de la Mitidja (Blida), Cette démarche pourra ultérieurement être développée dans le cadre de nombreuses autres problématiques environnementales, économiques et agronomiques.

Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules
- Etude morphologique et microscopique
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests.

Chapitre 1:

Synthèse Bibliographique

1. Rhizosphère, micro-organismes

1.1 Le Sol

Le sol, constitué d'une phase solide (matière organique et inorganique), liquide, et gazeuse (CO₂, O₂, N) (Gobat *et al.*, 2004), est soumis à des menaces anthropiques, facteurs d'érosion, perte de matières organiques, contaminations, tassement, salinisation, imperméabilisation, glissements de terrain, perte de biodiversité et de fertilité. Il est établi que dans un sol vivant, les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans les cycles bio-géochimiques terrestres et dans le fonctionnement des écosystèmes (Aglar *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2013). De plus c'est un champ en expansion car de plus en plus de rhizobia sont isolés et caractérisés, en particulier des zones méditerranéennes et tropicales, où la diversité est encore mal documentée (Zakhia & Lajudie, 2001).

1.2 La rhizosphère

A la fin du 19^{ème} siècle, il a été largement admis que les plantes encouragent la prolifération des microorganismes autour de leurs racines, cela a conduit Lorenz Hiltner à définir, en 1904, la rhizosphère comme étant « la partie du sol qui entoure immédiatement les racines de la plante » (Elmerich, 2007). Le terme « Rhizo » vient du grec rhiza signifiant racine. « Sphère » vient du latin sphaera (même sens), mot provenant lui-même du grec ancien sfaira (signifiant balle, ballon, ou globe). La sphère définit le champ d'influence du système racinaire. En raison du volume qu'elle occupe, par rapport au volume de la plante, la rhizosphère est aussi appelée la « moitié cachée » (the hidden half en anglais) (Bowen et Roriva, 1991). Et elle a été largement subdivisée en trois zones (Clark 1949; Lynch 1987; Pinton *et al.* 2001) Figure 1.

1. Endorhizosphère: qui se compose du tissu racinaire, y compris l'endoderme et les couches corticales.
2. Rhizoplane: c'est la surface racinaire où adhèrent les particules du sol et les microbes. Il se compose d'épiderme, de cortex et d'une couche de polysaccharide mucilagineux.
3. Ectorhizosphère: qui consiste en un sol immédiatement adjacent à la racine

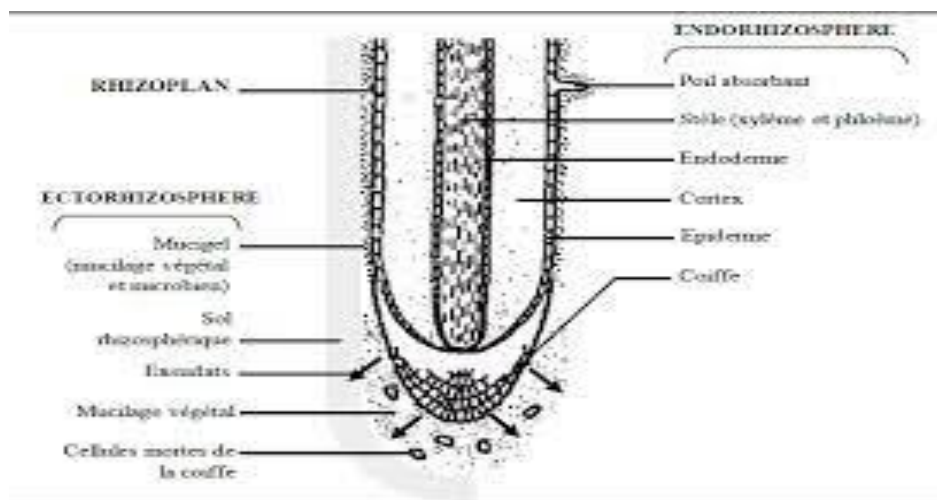


Figure 1 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (Lynch 1983, Lepinay., 2015).

1.3 L'impact de rhizosphère sur les microorganismes et les plantes :

- **Sur les micro organismes :** L'effet rhizosphère est déterminé en grande partie par la libération de rhizodéposition (**Stengel et Gelin., 1998**) ; En conséquence, les sources organiques d'azote, de carbone, de phosphore disponible stimulent le développement de la communauté bactérienne (**Latour et al., 1996**). Néanmoins, la compétition pour les minéraux solubles est intense, et les richesses de la rhizosphère ne sont pas réparties équitablement entre tous les micro-organismes du sol. Malgré cela ces micro organismes ont une activité métabolique élevée et se multiplient rapidement (**Davet, 1996**).

- **Sur les plantes :** L'activité rhizosphérique entraîne une meilleure assimilation des éléments minéraux par les plantes. Ainsi, l'énergie fournie par la rhizodéposition permet l'accroissement de la biomasse microbienne, puis la prolifération des prédateurs. Ce qui induit une activité enzymatique qui facilite la lyse des cellules desquamées des racines et la biodégradation de la matière organique du sol, en composées assimilables par la plante après minéralisation des éléments tels que le phosphore (**Davet, 1996**).

1.4 Les bactéries rhizosphériques : Applications dans les différents domaines de la biotechnologie microbienne

Une grande variété de micro-organismes est présente dans le sol. Ces diverses communautés constituent « un méta génome du savoir ». Ce méta génome s'étend également aux communautés microbiennes à l'intérieur et à l'extérieur de notre corps.

En raison de leurs actions métaboliques, ils sont des acteurs majeurs non seulement de notre santé et de notre bien-être, mais également de la durabilité environnementale (**Verstaete et al. 2007**).

Les utilisations de micro-organismes comme les bactéries rhizosphérique dans les industries pharmaceutiques et alimentaires sont énormes. De même, l'exploitation environnementale pour la bioremédiation du sol, de l'eau et d'autres habitats pollués par des polluants organiques et inorganiques (**Tableaux n°1**).

Tableaux n°1 : Quelques applications des bactéries rhizosphériques dans les différents domaines de la biotechnologie microbienne.

Domaine	Applications	Référence
Agriculture	<p>Le filtrat de <i>Methylobacterium fujisawaense</i> a inhibé l'éclosion des œufs de nématodes à galles <i>Meloidogyne incognita</i> avec un taux de 99,6 à 100% en 24 heures et causant la mort chez les juvéniles.</p> <p><i>Mesorhizobium ciceri</i> ont été criblés pour leurs effet antagonistes envers <i>Fusarium oxysporum f.sp. ciceri</i>. Et production de séderofor.</p>	<p>Prabhu et al., (2009). Khan et al. (2018).</p> <p>Suman et Yadav, (2015).</p>
Industrie	<p>Valorisation des déchets pour produire des inoculations Rhizobienne : fermentation de <i>Sinorhizobium meliloti</i> souche A2 provenant de la collection d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada (Sainte-Foy, Québec) dans des biosolides afin de produire un bio-fertilisant a base de <i>Rhizobium</i>.</p>	<p>Guillaume Dufresne, (2004).</p>
Environnement	<p>Les propriétés anioniques des EPS Rhizobienne leur permet à de fonctionner comme un biosorbant pour la rémédiation des métaux</p> <p><i>Mezorhizobium metallidurans</i> STM2683T est une souche symbiotique qui a été isolée à partir de la légumineuse <i>Anthyllis vulneraria</i> en France à une capacité de tolérer des taux élevés des zincs et cadmium sur un milieu riche.</p>	<p>Sheng GPet et al., (2010). (Leonel TF et al., (2019).</p> <p>Vidal et al., (2009).</p>
Santé	<p>Les EPS rhizobienne purifiée peut inhiber de manière significative la croissance des tumeurs transplantées chez les souris par rapport aux témoins modèles. Ainsi, les EPS peuvent être considérés comme des «systèmes de délivrance de médicaments intelligents» ou des «thérapies intelligentes».</p>	<p>Patel et al., 2011).</p>
Alimentaire	<p>Le curdlane est un 1,3-β-glucane (polysaccharide) produit par les bactéries du genre <i>Agrobacterium et Rhizobium</i>. À cause de ces propriétés, le curdlane est utilisé au Japon pour améliorer et modifier la texture des aliments comme le tofu, les pâtes de poisson et les gels de fèves.</p>	<p>Sutherland, (1998).</p>
Génie génétique	<p>transféré l'ADN chromosomique de l'espèce <i>Bacillus</i> tolérante au sel dans <i>R. leguminosarum</i>. Cette souche rhizobienne est devenue tolérante au sel et lorsqu'elle a été inoculée avec des lentilles, elle a amélioré le rendement des plantes et la teneur en azote du sol et de la plante dans le sol désertique.</p>	<p>Talaat El-Saidi et Ali (1993).</p>

2. Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR)

2.1 GENERALIES

L'augmentation de la production agricole pour répondre aux demandes des marchés de consommation et de la population mondiale croissante repose sur l'utilisation d'une grande quantité d'engrais chimiques et de pesticides, qui sont souvent sur utilisés dans le sol (**Kumar et al., 2017**). De nombreuses études ont démontré la capacité des micro-organismes favorisant la croissance des plantes à améliorer l'état nutritionnel des plantes et à réduire l'utilisation des pesticides (**Aloo et al., 2019**).

Le terme PGPR a été introduit pour la première fois à la fin des années 1970, lorsqu'il a été démontré par Kloepper et Schroth (**Kloepper, 1980**), que des souches de *Pseudomonas fluorescens* ont amélioré le rendement des cultures de pommes de terre jusqu'à 500% en produisant des sidérophores et des chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (**Garcia et al., 2003**).

2.2 Mode d'action des PGPRs

Les PGPRs présentent un nombre multiple de mécanismes qui visent à promouvoir la croissance de la plante. Leurs mécanismes d'actions sont soit directs et se déroulent à l'intérieur de la plante et affectent directement son métabolisme, soit indirects et ont lieu en général à l'extérieur de la plante. (**Tableau n°2 et Figure 2**).

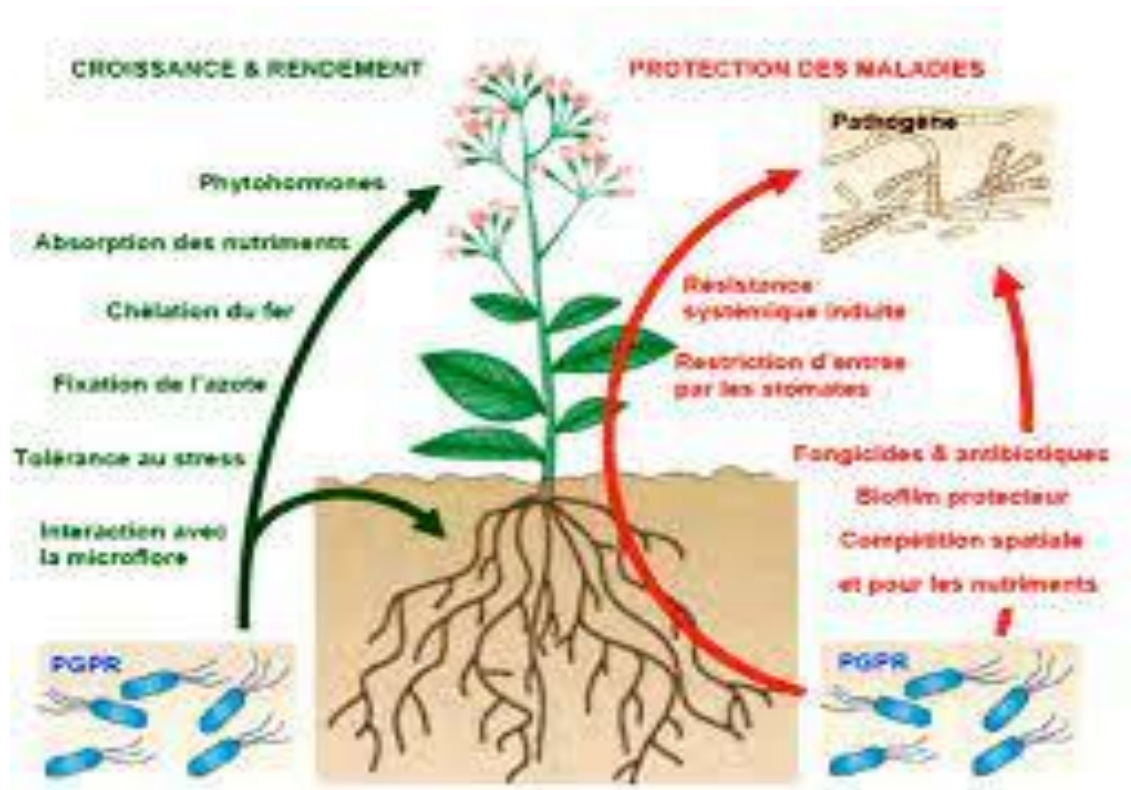


Figure 2 : Les mécanismes d'action des Rhizobactéries (**Ramos et al., 2009, Benmati.,2014**).

2.2.1 Les modes d'action directs

Ils comprennent l'amélioration de la nutrition des plantes en fournissant des phytonutriments comme l'azote ou des minéraux solubilisés du sol (comme P, K, Zn, Fe et d'autres nutriments les minéraux essentiels) et / ou en stimulant la croissance et le développement des plantes en régulant la phytohormone comme auxines, cytokinines, gibbérellines, acide abscisique et éthylène (**Kalam, S.; Basu, A.2020**).

- **Production des phytohormones (phytostimulateurs)**

Les phytostimulateurs ou substances organiques qui développent des plantes à faible phytostimulateurs peuvent être assurés (producteur) ou induits (inducteur) par les PGPRs.

- **Les auxines et (AIA) :** Les auxines ont été les premières hormones végétales découvertes vers 1880, lorsque Charles Darwin et son fils Francis ont réalisé une série d'expériences afin de déterminer l'influence de la lumière sur la direction de la croissance de l'avoine (phototropisme). C'est une phytohormone importante qui est vitale pour le développement et la croissance des plantes. Elle est nécessaire à la progression du cycle cellulaire et à la levée de la dormance des bourgeons (**Rios et al., 2014**). Elle affecte la taille de la pousse et des méristèmes racinaires, définit la morphogenèse des fleurs et la position des primordiums des organes latéraux (**Demeulenaere et al., 2014**).

L'AIA des PGPRs est impliqué dans l'élargissement des tissus vasculaires, l'initiation des racines latérales, la stimulation de la division cellulaire et l'allongement des tiges (**Kenneth et al., 2019 ; Spaepen., 2007**).

- **Les gibbérellines:** L'acide gibbérellique intervient au développement du tissu de la tige, à l'allongement radicaire et latéral et à l'extension des racines. Ce sont des diterpènes tétracycliques qui influencent grandement les processus de germination des graines, d'expansion des feuilles, d'allongement des tiges, du développement et maturation des fruits de floraison (**Van Loom, 2007**). L'application exogène de ces hormones ou des organismes qui les produisent peut-être utile dans la restauration des sols pollués et l'amélioration des performances des cultures (**Kenneth et al., 2019 ; Prasad et al., 2019 ; Yamagushi, 2008**).

- **Les Cytokinines:** Les cytokinines représentent un trait important à rechercher pour la sélection de bons PGPR. Ils jouent un rôle crucial dans le contrôle de la division cellulaire végétale, du cycle cellulaire, de la sénescence des feuilles et de la mobilisation des nutriments, de la formation des méristèmes apicaux des pousses, de la dormance et de la germination des graines, du développement floral, etc (**Niranjana et Hariprasad, 2014 ; Maheshwari et al., 2015 ; Wong et al., 2015**).

- **Fixation d'azote**

Les PGPRs les plus connus pour leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique sont : *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* ; *Azotobacter Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense*, qui transforment l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (**WEYENS et al., 2010; ARORA et al., 2012**).

- **Solubilisation du potassium**

(Kumar et Dubey, 2012) On a signalé que les microorganismes des sols jouaient un rôle clé dans le cycle K naturel et, par conséquent, les micro-organismes solubilisants de potassium présents dans le sol pourraient fournir une technologie alternative pour rendre le potassium disponible pour l'absorption par les plantes.

- **Solubilisation du phosphate**

Le phosphore (P) est un élément largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental de la vie des plantes et des animaux. Le phosphore a un rôle important dans le métabolisme de la plante, et il est l'un des éléments nutritifs essentiels pour la croissance et le développement des végétaux. Cependant, le phosphore existe sous forme inaccessible pour la plante, il reste donc de le mobilisé dans le sol (QURESHI *et al.*, 2012).

2.2.2 Les modes d'action indirects des PGPR

Ils comprennent l'influence sur la santé des plantes en supprimant les phytopathogènes et autres microorganismes délétères par le parasitisme, la compétition pour les nutriments et la niche dans la rhizosphère, la production de substances antagonistes (comme le cyanure d'hydrogène, les sidérophores, les antibiotiques et les métabolites antimicrobiens) et les enzymes lytiques (comme les chitinases, les glucanases et les protéases) et induisant une résistance systémique chez les plantes contre un large spectre d'agents pathogènes racinaires et foliaires (Divyanshu, K *et al.*, 2020).

- **Production d'antibiotiques**

Les antibiotiques sont des toxines de faible poids moléculaire produites par la communauté bactérienne et capables d'éliminer ou de réduire la croissance d'autres micro-organismes (Bakker *et al.*, 2013). Des amphysines, des phénazines, du 2-4-diacétylflooroglucinol, de la piolutéorine, de la pyrrolnitrine, du cyanure d'hydrogène (HCN), des oomycines, de la polymyxine, de la circuline, de la colistine, de la tensine, de la tropolone et des lipopeptides cycliques ont été identifiées (Maksimov *et al.*, 2011; Pandya et Saraf, 2014 ; Wani et Khan, 2014; Sherathia *et al.*, 2016).

- **Résistance systémique induite (ISR) :**

L'ISR est décrite comme une capacité défensive améliorée des plantes en réponse à divers agents pathogènes induits par des microorganismes bénéfiques présents dans la rhizosphère (Conrath *et al.*, 2015), *Bacillus cereus* (Conn *et al.*, 2008), *Rhizobium leguminosarum*, *P. putida* et *Serratia marcescens* (Bhattacharyya et Jha, 2012) sont des exemples de Rhizobactéries qui subissent des ISR.

- **Production de sidérophores :**

Pour obtenir du fer pour la croissance des plantes et leur développement, certaines bactéries synthétisent des molécules chélatantes du fer de faible poids moléculaire appelées sidérophores (Shaikh et Sayyed, 2015; Mhlongo *et al.*, 2018).

Les bactéries productrices de sidérophores peuvent stimuler la croissance des plantes directement, améliorant la nutrition des plantes en Fe, ou indirectement, inhibant l'activité des agents pathogènes des plantes dans la rhizosphère, ce qui limite leur disponibilité en Fe (Ma *et al.*, 2011). En plus du fer, il existe des preuves indiquant que les sidérophores forment des composés stables avec d'autres métaux potentiellement toxiques, tels que Al, Cd, Cu, Pb et Zn (Gururani *et al.*, 2013). Plusieurs espèces bactériennes sont capables de produire des sidérophores, notamment *Azospirillum* (Banik *et al.*, 2016), *Klebsiella* (Zhang *et al.*, 2017), *Pseudomonas* (Pourbabaee *et al.*, 2018).

Tableau n°2: Formes de PGPR et leur mécanisme d'action stimulant la croissance des plantes (Martinez *et al* 2010)

Formes de PGPR	Définitions	Mécanisme d'action	Référence
Biofertilisant	Une substance qui contient des micro-organismes vivants qui, lorsqu'elle est appliquée sur la graine, la surface de la plante ou le sol, colonise la rhizosphère et favorise la croissance de la plante grâce à un apport accru de nutriments primaires pour la plante hôte	Fixation biologique de l'azote Utilisation de phosphore insoluble	Vessey (2003) Somers et al. (2004)
Phytostimulateur	Micro-organisme, avec la capacité de produire des phytohormones telles que l'acide indole acétique, l'acide gibbérellique, les cytokinines et l'éthylène	Production de phytohormones	Lugtenberg et al. (2002), Somers et al. (2004)
Biopesticide	Micro-organismes qui favorisent la croissance des plantes en contrôlant les agents phytopathogènes	Production d'antibiotiques, sidérophores, HCN Production d'enzymes hydrolytiques Résistance systémique acquise et induite	Vessey (2003) Somers et al. (2004) Chandler et al. (2008)

3. Les macrosymbiotes : Les légumineuses

3.1 GENERALIES

Les légumineuses sont apparues pour la première fois sur Terre il y a environ 70 millions d'années (**Polhill et al., 1981**). Elles sont des végétaux supérieurs qui appartiennent à la famille des Leguminosae (ou Fabaceae), de l'ordre des Fabales. Elles forment l'une des plus grandes familles de plantes (**Broughton, 1983**).

Les légumineuses se divisent en trois sous-familles:

- **Papilionoideae** : Appelées Papilionacées, en raison de la forme de la corolle en « papillon », comprennent de nombreux représentants : les Trèfles, les Pois, les Haricots (**Dupont et Guignard, 2015**). Chaque sous-famille est représentée par un nombre variable d'espèces, mais celle des Papilionoideae constitue la plus grande et la plus diversifiée avec 503 genres pour près de 14 000 espèces (**LPGW., 2017**). Dans cette sous-famille, 97 % parmi les espèces testées sont nodulées par les rhizobia. Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes mais comprennent aussi des arbres et des arbustes (**Chaich., 2018**).
- **Mimosoideae** ; La sous-famille des Mimosoideae rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons, Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (**Tourene., 2018**). Elles comprennent surtout des ligneux des pays chauds, les flamboyants (*Delonix regia*), parure des tropiques ou le Caroubier, seule espèce méditerranéenne de la sous-famille (**Dupont et Guignard, 2015**). Cette sous-famille possède à l'heure actuelle 62 genres et environ 3270 espèces, dont les majorités (90 %) sont nodulées parmi les 10 % testées (**Chaich., 2018**).
- **Caesalpinoideae** La sous-famille des Caesalpinoideae, avec une fleur pseudo-papilionacée. Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux, leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (**Tourene., 2018**).

Les Fabacées ont la particularité de vivre en symbiose avec les bactéries installées dans des nodosités racinaires (ou plus rarement caulinaires) et assimilant l'azote atmosphérique (**Marouf et Reynaud, 2007**). Actuellement seul 23 % des espèces testées sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces se retrouvent dans les tribus des Caesalpinieae et Cassieae. Les tribus Cercideae, Detareae et Amherstieae sont très peu nodulées (**Chaich, 2018**).

3.2 L'intérêt des légumineuses et leurs différentes utilisations :

Singh et coll. (2007) documenté que les légumineuses sont importantes et font partie intégrante de la civilisation humaine :

- certaines espèces de cette famille peuvent contracter une symbiose avec une bactérie du genre *Rhizobium*, pour permettre un accès privilégié à l'azote de l'air. Par cette symbiose, les plantes de cette famille s'affranchissent de la teneur en azote dans le sol (**Fernand Wathan, 1967**). aussi utiliser en phytoremédiation, pour le piégeage et la dégradation de contaminants du sol, tels : les herbicides, les pesticides et les métaux lourds (**Afzal et al., 2014**)

- Plusieurs légumineuses ont été utilisées dans la médecine populaire. Les isoflavones du soja et autres légumineuses ont été suggérées à la fois pour limiter les risques du cancer et afin de réduire le taux de cholestérol sérique (**Kennedy, 1995**). Les phytoestrogènes de soja ont été suggérées comme alternatives possibles à l'hormonothérapie substitutive pour les femmes ménopausées (**Graham et Vance, 2003**).
- Industriellement, les légumineuses ont été utilisées pour préparer les plastiques biodégradables (**Paetau et al., 1994**), les huiles, les gommes, les colorants et les encres (**Morris, 1997**). Grâce à sa faible contribution au réchauffement climatique par rapport aux combustibles fossiles, le biodiesel à base de soja est un bon carburant alternatif qui a pris sa place dans plusieurs pays.
- les légumineuses jouent un rôle important dans la productivité agricole mondiale en convertissant chaque année environ 120 millions de tonnes d'azote atmosphérique en ammoniac (**Freiberg et al., 1997**), économisant ainsi 6,8 milliards de dollars de dépenses en engrais azotés (**Herridge & Rose, 2000**).
- En industrie agroalimentaire, certaines légumineuses peuvent être transformées en farine, utilisée pour faire du pain, des beignets, chips, pâtes à tartiner etc., ou même utilisées sous forme liquide pour produire des laits, yaourts, et les préparations pour nourrissons (**García et al., 1998**).

3.3 Notre modèle d'étude : *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides*, *vicia sativa* et *Trifolium hybridum*

3.3.1 Espèce *Lotus edulis* L.

- **GENERALITES:**

Les *Loteae* constituent un groupe important de la flore des légumineuses d'Algérie au niveau de laquelle elle est représentée par au moins 75 taxons répartis sur 12 genres (**Quezel et Santa, 1962 ; ILDIS, 2002**) ce qui en fait une des plus importante de la famille des légumineuses d'Algérie puisqu'elle représente à elle seule près d'un sixième de la biodiversité de ce groupe de plantes. Les *Loteae* d'Algérie sont représentées essentiellement par des espèces herbacées et arbustives parmi les genres « le *Lotus* » qui est le genre le plus important et le plus représentatif de la tribu des *Loteae*. C'est un genre cosmopolite qui comprend plus de 150 espèces (plantes annuelles et vivaces) avec deux grands centres de diversité, la région méditerranéenne (y compris des parties d'Europe, d'Afrique et d'Asie occidentale) et de l'ouest de l'Amérique du Nord (**Howieson et al., 2000 ; Sokoloff et Lock, 2005**), et en raison de leur capacité à former une symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia, les représentants du genre *Lotus* sont des plantes pionnières et une source de biomasse riche en protéines, ce qui leur confère un intérêt écologique et agropastoral (**Laouar., 2004**).

En Algérie, le genre *Lotus* est représenté par 26 taxons qui se rencontrent en majorité et fréquemment au niveau de la frange littorale et les hauts-plateaux du pays sous des régimes

climatiques allant du semi-aride à l'humide en allant d'ouest en est (Quezel et Santa 1962; Ozenda 1983, 2004).

- **Description botanique de l'espèce**

L'espèce *L. edulis* est une plante herbacée comestible annuelle connue en Grèce sous le nom commun de «Peratzouni» (Spanou, C. *et al.*, 2008). Cette espèce croît sur les coteaux et les lieux sablonneux du littoral méditerranéen. Elle est bien caractérisée par son fruit épais, charnu et légèrement courbé. Les fleurs, assez grandes, sont solitaires ou par deux (Figure 3).



Figure 3: Espèce *Lotus edulis* (https://www.florealpes.com/fiche_lotusedulis.php)

3.3.2 Espèce *Lotus ornithopodioides*.

- **Description botanique**

Lotier à pied d'oiseau" est une fabaceae annuelle, suffrutescente, rameuse, pubescente dont les racines pivotantes pourvues de nodosités. Les feuilles sont trifoliées à folioles entières, stipules ovales, à 03 feuilles florales. Les gousses sont placées les unes sur les autres en groupes ressemblant à une patte d'oiseau, après quoi la plante tire son nom (Figure 4).

C'est une espèce rocheuse méditerranéenne qui prospère dans les zones incultes et sur les prairies arides de la Méditerranée (Martinčić & *al.*, 2007). Parmi les caractéristiques des espèces *L. ornithopodioides* : incluent un système racinaire relativement profond, une production de graines prolifique, une tolérance aux insectes, une excellente rétention des gousses sur les tiges et une fragmentation minimale des gousses par rapport aux autres espèces du genre (Loi *et al.*, 2002),



Figure 4 : Espèce *Lotus ornithopodioides* L (<https://www.preservons-la-nature.fr/flore/taxon/2858.html>)

3.3.3. Espèce *Vicia sativa* L (La vesce commune)

- GENERALITES :

La vesce est une légumineuse endémique aux zones tempérées de l'hémisphère nord, à l'Amérique du Sud, à l'Afrique, aux îles Canaries et à Hawaï. Elle n'a pas besoin de fumure azotée, mais les coûts en semences sont plus élevés que chez les crucifères. La vesce est capable de stocker, en deux à trois mois, 60 à 80 kg d'azote par hectare dans la couche superficielle du sol (Bodson et Vandenberghe, 2013).

Quézel et Santa (1962) mentionnent près de 36 espèces et sous-espèces de vesces spontanées en Algérie.



Figure 5 : Différentes parties d'une plante de vesce (Thomé 1885)

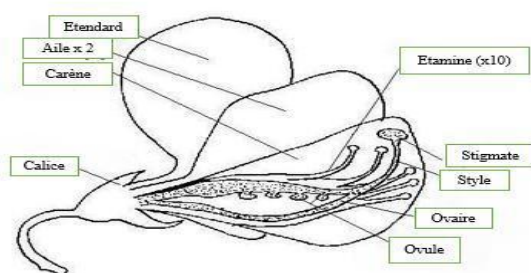


Figure 6: Schéma d'une fleur de Papilionacée (Anonyme 2014)

- Description botanique de l'espèce

C'est une plante spontanée dans toute l'Eurasie tempérée, elle s'est naturalisée en maintes régions du globe. Très variable, elle compte plusieurs sous-espèces, dont certaines sont cultivées comme fourrage, alors que d'autres sont de simples adventices (Burrnie *et al.*, 2005). Ce sont des plantes annuelle de 30-80 cm, pubescentes, grimpantes; feuilles à 5-7 paires de folioles larges, tronquées ou échancrées ; vrilles rameuses ; stipules dentées, tachées ; fleurs grandes (2-3 cm), à étendard violacé avec ailes d'un pourpre brun, géminées, rarement solitaires, subsessiles ; calice à dents égales, égalant le tube ; gousse de 40-60 mm sur 6-10, large, comprimée, bosselée, non stipitée, dressée ou étalée, pubérulente, d'un fauve pâle à la maturité ; graines grosses, subglobuleuses, séparées par du tissu cellulaire. Plante polymorphe (www.aujardin.info) (Figure 5 et 6).

3.3.4 Espèce *Trifolium hybridum* (trèfle hybride).

- GENERALITES :

Le genre *Trifolium* renferme environ 290 espèces réparties à travers les régions tempérées et subtropicales mais principalement dans les régions tempérées du nord (Clapham *et al.*, 1962). En Algérie, une classification générique a permis de classer le genre *Trifolium* (37 espèces) (Quézel et Santa, 1962), parmi les plus riches au sein des légumineuses fourragères (Issolah et Beloued, 2005).

La présence d'une variation enzymatique riche chez certaines espèces de trèfles en Algérie indique l'intérêt de ces ressources dans le domaine de l'amélioration (**Medoukali et al., 2015**). La valorisation du trèfle souterrain contribuerait au développement des produits d'élevage en montagne, particulièrement dans le Nord-Est de l'Algérie, qui constitue la région la plus arrosée du pays (**Issolah et al., 2016**).

- **Description botanique de l'espèce**

Le trèfle hybride est une plante de fourrage vivace dressée ou presque érigée qui reste présente dans les champs même lorsqu'elle n'est plus cultivée et apparaît le long des routes sous forme naturalisée. Elle a été signalée dans la nature en 1762.

C'est une plante annuelle ou bisannuelle de 25 à 60 cm, à tige glabre, ascendante et peu ramifiée. Les feuilles sont alternes, trifoliolées, à folioles étroites, émoussées et dentées, de 1 à 2 cm de long. Les stipules unies au pétiole (**Wikiwix Archive, 2017**). La floraison a lieu de juillet à août. Les fleurs sont d'un blanc sale ou rosées et assez grandes. Les gousses sont des cosses indéhiscentes incluses dans le calice. Les fleurs sont à corolle irrégulière (zygomorphe) de 7 à 12 mm de long. Les cinq pétales sont blancs à rougeâtres, puis marrons. Capitule de fleurs blanc et rose réunies en une tête, 20-35 mm de largeur, sur un long pédoncule (**Parent et Sylvain, 1959; Leboeuf et Michel, 1962**). De plus c'est une plante qui s'adapte aux terrains compactés, humides et asphyxiants, dotée d'une grande résistance au froid (**Gnis.fr**) **Figure 7**.



Figure 7: Espèce *Trifolium hybridum* (**Keir Morse, 2016**)

4. Le microsymbiot : Bactéries nodulant les légumineuses (BNL)

Les bactéries nodulatrices de légumineuses (BNL) sont des bactéries du sol à Gram négatif qui fixent l'azote après être devenues des nodules de racines internes établis de légumineuses. Au cours des dernières années, une grande diversité de BNL a été révélée, ce qui a entraîné des changements considérables dans la taxonomie de ces bactéries. La taxonomie actuelle du BNL révèle une grande diversité au niveau du genre, des espèces et intraspécifiques. La plupart de ces espèces bactériennes appartiennent à la famille des Rhizobiacées dans la classe α des protéobactéries: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* (*syn. Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium* (**Jourand et al.2004**), *Devosia* (**Rivas et al.2003**), *Blastobacter* (**Eardly 2002**), *Ochrobactrum* (**Trujillo et al.2005**) et *Phyllobacterium* (**Mantelin et al.2006**). De plus, environ huit espèces rhizobiennes appartenant à deux genres de la classe β des Protéobactéries (*Burkholderia* et *Ralstonia*) ont été signalées (**Moulin et al., 2001**). Par ailleurs, des souches d'*Agrobacterium* ont été isolées à partir de nodules de nombreuses espèces de légumineuses (**Mahdhi et al.2008**), mais aucune explication définitive de la présence de ces

bactéries à l'intérieur des nodules pourrait être démontré. De plus, des bactéries de la classe γ des *protéobactéries* ont également été signalées (Shiraishi *et al.*, 2010).

4.1. *Rhizobium* (microsymbiote).

4.1.1 GENERALITES

Peu de groupes de bactéries ont été aussi minutieusement étudiées que les *Rhizobia*. Les travaux qui ont mené à leur isolement et à leur utilisation sont parmi les plus importants progrès provenant de la bactériologie du sol. On attribue aux rhizobia deux propriétés distinctives. Premièrement, les *Rhizobia* ont l'habilité d'envahir les racines des légumineuses et de stimuler la production de nodules et deuxièmement, ils ont l'habilité d'effectuer la symbiose avec leur plante hôte spécifique ayant comme résultat la fixation de l'azote atmosphérique. Ces deux propriétés confèrent aux *Rhizobia* leur lettre de noblesse dans le monde de l'agriculture.

Le terme de *Rhizobium* a été utilisé en premier pour désigner ces bactéries formant des nodules sur les légumineuses. Du grec, «Rhizo» =racine et «bium» =vivant. Dénommé ainsi par Franck car ce microorganisme vit dans les racines. Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses ou BNL sont des bactéries aérobies, Gram négatives, mobiles, sans spores dont la vitesse de croissance sur le milieu YMA (Vincent, 1970) est variable. Ainsi, Jordan (1984) attribue le nom de *Bradyrhizobium* aux souches qui sont à croissance lente. Du point de vue phylogénétique, elles font partie de la sous-classe alpha (Stackebrandt *et al.*, 1988) ou Bêta des protéobactéries (Moulin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2001). Ces bactéries ont la particularité de posséder les gènes permettant la synthèse d'un complexe enzymatique nitrogénase/hydrogénase qui permet la fixation d'azote (Sakrouhi, 2017).

4.1.2 La classification et taxonomie

D'après Bergey (1974) :

Règne : Bactéria

Embranchement : Proteobacteria

Ordre : Eubacteriales.

Famille : Rhizobiacées.

Genre : *Rhizobium*

(Frank, 1889)

Actuellement, les *Rhizobium* comportent 13 genres et 117 espèces (wier.,2016). Elles appartiennent à la subdivision alpha des protéobactéries dans les genre de :*Rhizobia*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* (Zakhia et De Lajudie,2001).

Les rhizobium isolés jusqu'à présent appartenaient tous groupe des alpha-Proteobacteria .D'après Somasegaran et Hoben (1994),on distingue trois groupes de rhizobia :

-les *Rhizobia* à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours.

-Les *Mesorhizobium* à croissance moyenne qui produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-4 jours.

-Les *Bradyrhizobium* à croissance lent qui produisent un trouble dans le milieu dans 4-5 jours

(Figure 8).

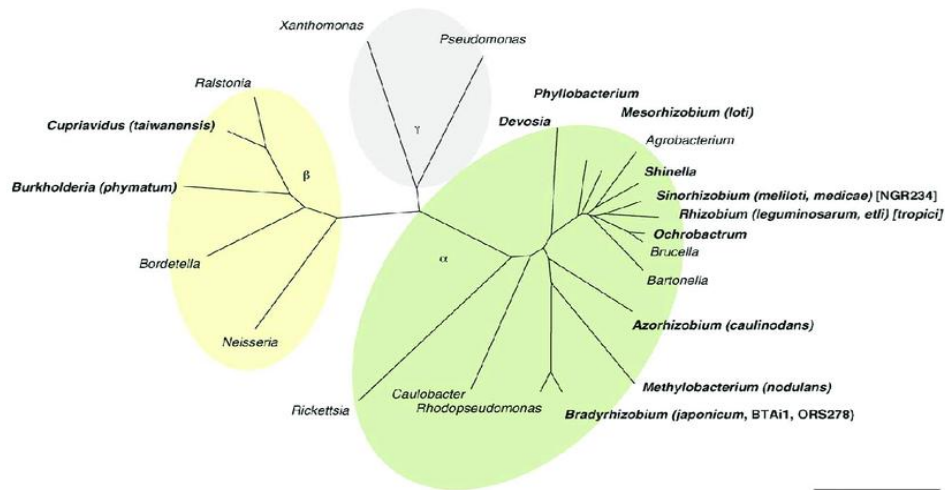


Figure 8: Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α -, β et γ -protéobactéries. Les genres en gras contiennent les *rhizobium* nodulant les légumineuses (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

4.1.3 Les principales caractéristiques

- **Caractères symbiotiques**

Le principal caractère distinctif des rhizobia est l'infectivité ou la capacité d'établir une relation symbiotique avec une ou plusieurs espèces des plantes légumineuses et qui s'exprime par la formation des nodules (Prin *et al.*, 1993). Le caractère d'effectivité ou d'efficacité est défini par la capacité de ces rhizobia à réduire l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, à l'intérieur des nodules, qui se traduit par la couleur rouge ou rose de ces dernières (présence de l'enzyme de fixation d'azote. Sadowsky *et al.*, 1983).

- **Caractères morphologiques**

Deka et Azad (2006) ont rapporté que les cellules de tous les isolats de *Rhizobium* étaient en forme de bâtonnets, mobiles et à Gram négatif variant dans la gamme de $0,6-0,8 \times 1,6-2,5 \mu\text{m}$ en taille. En ce qui concerne la configuration, la marge, l'élévation et la couleur ont été observées. Gachande et Khansole (2011) ont observé que les colonies étaient circulaires, rose clair, convexes, entiers et opaques. La bactérie était en forme de bâtonnet, aérobic, ne formant pas de spores. Phylogénétiquement elles appartiennent à la subdivision d'Alpha- Proteobacteria, contiennent souvent des granules de poly- β -hydrox butyrate, oxydase et catalase positive, mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien 2 à 6 flagelles péritriches,

- **Caractères biochimiques et nutritionnels :**

- ✓ **Source de carbone :** Les sucres suivants : D ribose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-arabinose, L-arabonose, sont utilisés par *Rhizobium*, non par *Azorhizobium*. D'autres sucres notamment D-maltose, D-cellobise, lactose, inositol raffinose sont utilisés par *Rhizobium* seul et non *Azorhizobium*. Pour résumer l'*azorhizobium* n'assimile pas les sucres excepté le glucose mais elle utilise les acides organiques comme le lactate pour les cultiver (Jarvis *et al.*, 1997).
- ✓ **Source d'azote :** *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* utilisent NH_4^+ comme source d'azote, les *Rhizobiums* peuvent pousser bien sur l'extrait de levure et de nombreux extraits complexes d'origines végétales (Vincent., 1977). Ils peuvent

également utiliser les acides aminés comme source d'azote. Néanmoins cette utilisation varie selon les espèces (**Jordans., 1984**).

- ✓ **Résistance et sensibilité aux antibiotiques** : L'étude de la résistance aux antibiotiques est indispensable pour la classification des bactéries et pour la préparation des milieux sélectifs permettant leur isolement à partir du sol (**Bergey's, 1984**). Grâce à l'utilisation de certains antibiotiques, il a été possible de différencier les bactéries à croissance rapides de celles à croissance lente. En effet, la majorité des espèces à croissance rapide ont été étudiées par Vincent 1977.

- **Caractères physiologiques**
 - ✓ **La température** : Les *Rhizobiums* sont considérés généralement comme des bactéries mésophiles (**Eikan, 1992**), leur température optimale de croissance varie en fonction de l'espèce mais généralement elle est située entre 25° et 30°C grâce à la température optimale.
 - ✓ **Le pH** : La plupart des *Rhizobiums* croissent à un pH optimum de 6-7 mais il existe quelques espèces très tolérantes aux pH acides. Comme exemples : *B japonicum* supportant des pH allant de 3,4 à 4 (**Gabhard, 1984**).

- **Caractères cultureux**

Deux groupes de *Rhizobiums*, le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Le deuxième est le groupe des rhizobia à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (**Somasegaran et Hoben, 1994**) **Tableau n° 3**.

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de *Rhizobiums* (**Vincent, 1970**). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanches, opaques ou laiteuses, humides, translucides. Elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Les bactéries correspondant aux formes non différenciées en bactéroïdes sont les seules capables de pousser sur boîte de Pétri (**Boivin-Masson et al., 2006**).

Tableau n° 3 : Principales caractères distinctifs entre les rhizobiums à croissance rapide et lente (Elkan, 1992 in Haddadji, 2002 modifié).

Caractéristique	Rhizobiums à croissance rapide	Rhizobiums à croissance lente
Temps de génération	Inférieur à 6 heures	Supérieur à 6 heures
Nutrition carbonée	Utilisent une grande variété de sources de carbone: pentoses, hexoses, mono, di et tri-saccharides	Utilisent une variété réduite de sources de carbone: pentoses, hexoses
Flagellation	Péritriche	Subpolaire
Production de polysaccharides extracellulaires	Forte	Faible
Localisation de gènes symbiotiques	Plasmides et Chromosomes	Chromosomes
Localisation de gènes de fixation	nif H, nif D, nif K sur le même opéron	nif H, nif D, nif K sur des opérons séparés
Résistance aux antibiotiques	Faible	Elevé
Réaction en milieu de culture	Réaction acidifiante	Réaction alcalinisante
Espèces nodulées.	Légumineuses des régions tempérées	Légumineuses des régions tropicales

- **Tolérance à la salinité**

La sensibilité des souches de *Rhizobium* à la salinité varie d'une souche à l'autre, cette variabilité s'exprime non seulement dans un même groupe, mais également chez les mêmes souches isolées d'une même plante (Bekki, 1983), une concentration de 0,6 de NaCl ou 0,23 M de KCl est en générale inhibitrice.

4.1.4 Approches d'étude de la diversité des Rhizobia

Deux types d'approches sont actuellement les plus utilisés pour étudier la diversité des rhizobiums. Il s'agit des approches phénotypiques (surtout physiologiques) et des approches moléculaires.

- **Les approches phénotypiques**

Ces approches font appel principalement aux caractéristiques symbiotiques (la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée), morphologiques (les caractéristiques de la cellule bactérienne et de la colonie), biochimiques (la présence et/ou l'activité de différents enzymes tels que la glutamate déshydrogénase) et physiologiques (la tolérance des souches à certains facteurs de l'environnement telle que la salinité) des bactéries en utilisant des techniques standardisées (Zakhia et de Lajudie, 2006). Elles sont toujours admises comme étape primordiale pour la séparation et l'identification des souches nouvellement isolées et constituent la base de la description formelle des taxa. les critères retenus sont des critères physiologiques basés sur l'aptitude des souches à croître en présence de différents niveaux de certains facteurs environnementaux à savoir la salinité (NaCl), le stress hydrique, la température et le pH. Cette analyse phénotypique classique constitue la base de la microbiologie (Zakhia et de Lajudie, 2006).

- **Les approches moléculaires**

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les acides nucléiques ADN ou ARN. Elles sont actuellement les méthodes dominantes pour la caractérisation du fait que la nouvelle conception de la notion " diversité", suite aux progrès biotechnologiques, doit refléter la variabilité des génomes (les similarités et les dissemblances). Ces approches sont moins dépendantes des variables de croissance des bactéries, plus stable, prennent moins de temps, permettent, d'une part, la détermination des relations phylogénétiques entre les isolats microbiens et, d'autre part, de placer les souches dans leurs groupes spécifiques (**Abdelguerfi-Laouar, 2005**). Bien qu'à l'heure actuelle diverses techniques moléculaires sont disponibles, l'amplification d'ADN, appelée PCR (Polymerase Chain Reaction) est, certainement, la mieux adaptée pour étudier la biodiversité bactérienne (**Vandamme *et al.*, 1996**).

L'application de la rep-PCR aux rhizobiums a été initiée par de **Bruijn (1992)**. Ce dernier a utilisé la REP-PCR chez des souches de *S. meliloti* en utilisant des amorces de 18 à 22 pb conçues d'une manière complémentaire aux séquences inversées (**Versalovic *et al.*, 1991**). Depuis, ces PCR sont considérées comme des méthodes efficaces pour établir l'empreinte génomique des bactéries.

4.2 Mécanisme de fixation biologique d'azote chez les BNL

4.2.1 Les micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est une propriété de certains procaryotes. Cette fixation se fait grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N₂) en ammoniac (NH₃), forme de l'azote assimilable par les végétaux. La réduction d'une mole de diazote gazeux en ammoniac par la nitrogénase nécessite 16 moles d'ATP, ce qui en fait une réaction énergétiquement coûteuse. Pour cette raison, certaines espèces de microorganismes effectuent cette fixation d'azote lors d'interactions symbiotiques avec des plantes. (**Tableau n° 4**).

Tableau n° 4: Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote (**institute of Research for Development Rojer et Dreyfus, 1996**).

Microorganismes	Les exemples
Micro-organismes libres	<i>Azotobacter spp.</i> ; <i>Azospirillum lipoferum</i> ; <i>Trichodesmium</i> ; <i>Oscillatoria</i> <i>Gloeotheca</i> ; <i>Clostridium pasteurianum</i> ; <i>Desulfotomaculum spp.</i> ; <i>Methanobacterium spp</i> ; <i>Rhodospirillum rubrum</i> ; <i>Rhodobacter capsulate</i> .
Microorganismes symbiotiques	
• Légumineuses	<i>Rhizobium meliloti</i> ; <i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ; <i>Sinorhizobium fredii</i> <i>Azorhizobium caulinodans</i>
• Symbioses actinorhiziennes	<i>Frankia</i>
• Symbioses à cyanobactéries	<i>Anabaena azollae</i>

4.2.2 Fixation biologique 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**).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est un élément crucial des activités microbiennes dans l'environnement. Ce phénomène participe, carrément, au maintien de la vie sur terre. Ce processus se produit lorsque l'azote atmosphérique est converti en ammoniac par les nitrogénases microbiens (**Cherif, 2014**). L'azote représente 78% de l'atmosphère terrestre et c'est l'élément le plus important de la nutrition végétale. Certains PGPR ont la capacité de convertir l'azote atmosphérique en azote utilisable par les plantes (**Govindasmy et al., 2010**).

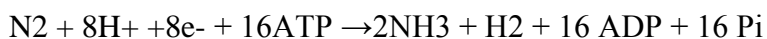
4.2.3 Biochimie de Fixation

- **La nitrogénase bactérienne**

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (**Rees et Howard, 2000**). Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez des procaryotes. Le complexe nitrogénase est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Il est constitué de deux métalloprotéines : le site de la réduction du substrat est la protéine MoFe (composant I ou dinitrogénase) et le donneur d'électrons est la protéine Fe (composant II ou dinitrogénase)

réductase). Le composant I est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ codé par les gènes *nifD* et *nifK* et le composant II est un homodimère codé par le gène *nifH* (**Howard et Rees, 2000**).

La régulation de l'expression de la nitrogénase est complexe ; elle fait intervenir au niveau transcriptionnel d'autres gènes *nif* de l'opéron (*nifA* et *nifL* notamment) et au niveau post-traductionnel un système d'ADPribosylation (répression de l'enzyme par NH_4^+ et l'obscurité). Le complexe nitrogénase est extrêmement labile en présence de dioxygène (**Halbleib et Ludden, 2000**). La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



- **La leghémoglobine**

La leghémoglobine, permet aux rhizobia de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule. Elle permet ainsi d'éviter l'inactivation de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène tout en assurant l'apport d' O_2 indispensable à ces bactéries aérobies. Elle est synthétisée par la plante-hôte (globine) et par le bactéroïde (hème) lié étroitement à la globine (**Salmi, 2019**).

- **Assimilation de l'ammonium**

Quelque soit l'origine du NH_4^+ celui-ci va être pris en charge, à l'intérieur de la plante, par un système enzymatique, GS-GOGAT. Sous ce nom barbare se cache deux enzymes travaillant à la chaîne. La première (GS pour Glutamine Synthase) rajoute un NH_3 à une molécule de glutamate. La glutamine ainsi formée, transfère un de ses groupements azotés à un acide céto-glutamate, grâce à la seconde enzyme GOGAT (pour Glutamine OxoGlutamate Amino Transférase). On obtient alors deux molécules de glutamate, les réactions peuvent alors s'enchaîner en boucle (**Brewin et col.,1992**).

- **L'assimilation et l'exportation de l'azote fixé**

À l'issue de la fixation symbiotique de N_2 , de l'ammoniac est libéré. Celui-ci doit être converti sous une forme organique avant d'être exporté hors des nodosités afin d'éviter une toxicité pour la plante. L'ammoniac est souvent protoné sous forme d'ions d'ammonium, avant d'être assimilé en glutamine ou asparagine à l'extérieur de la membrane péribactéroïdienne. L'étape finale de la fixation de l'azote est l'exportation de l'azote fixé dans les nodosités vers les autres parties de la plante hôte par le xylème sous la forme d'acides aminés dans le cas des pois (**Taiz et al., 2014; Hopkins, Rambour et Evrard, 2003**). **Figure 9**.

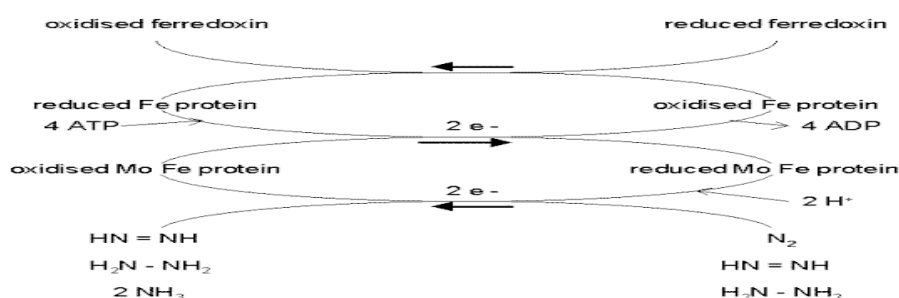


Figure 9 : Le processus biochimique de fixation de l'azote catalysé par les composants de la nitrogénase (**Deacon, 1997**).

5. le processus de la nodulation

5.1 La symbiose Rhizobium-légumineuses

Le terme symbiose qui étymologiquement signifie "vivre avec" est utilisé dès le 19^{ème} siècle pour définir une notion d'interaction entre au moins deux espèces différentes. Aujourd'hui, le mot symbiose est généralement utilisé pour décrire une association à bénéfice mutuel (**Geiman,**

1964). La symbiose est la forme la plus ancienne des interactions plante-microorganismes, elle agit sur les deux partenaires : la plante hôte et la bactérie. Cette évolution influe donc de façon concomitante sur la plante qui fabrique de nouveaux tissus pour abriter les microorganismes et acquière de nouvelles capacités métaboliques (fixation d'azote) et sur la bactérie où des récepteurs spécifiques évoluent permettant une reconnaissance et un attachement spécifique à la plante (**Boukhatem, 2013**).

Trois symbioses jouent un rôle particulièrement important.

1. En Asie l'association de cyanobactéries avec des fougères aquatiques, les *Azolla*, est exploitée pour servir d'engrais vert dans les rizières.
2. Des plantes ligneuses appartenant à plusieurs familles forment des nodosités fixatrices d'azote avec des bactéries filamenteuses (actinomycètes) du genre *Frankia*. Ces plantes, dites à *actinorhizes*, jouent un rôle important dans la colonisation de terres peu fertiles ou dégradées (**Dommergues et al. 1999**).
3. la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant des bactéries du sol, les *Rhizobium*, aux légumineuses. Bien que les légumineuses annuelles et vivaces naturelles sont bien nodulées et leurs nodules racinaires sont actifs dans la fixation de l'azote. Des études ont révélé que l'inoculation de *rhizobiums* à partir de légumineuses spontanées est efficace pour améliorer la symbiose Rhizobium-légumineuse.

5.2 Les nodosités

Les nodosités sont présentes chez les sous familles de Fabaceae : 90 % des espèces de Faboïdées, le sont également chez les Mimosoïdées (même pourcentage) et les Césalpinioïdées (1/3 des espèces), ce qui est une preuve supplémentaire de l'unicité des Fabales (**Dupont et Guignard, 2015**).

Il existe souvent une population considérable de bactéries dont le fond génétique est similaire à celui du rhizobia nodulant, mais qui manque des gènes nécessaires à la symbiose. Même parmi les bactéries qui possèdent les gènes de symbiose, la plante hôte peut encore être très sélective (**Zeze et al., 2001**). Dans les associations symbiotiques entre Rhizobium et les membres de la famille des légumineuses, les rhizobiums infectent la racine soit par les poils des racines, soit par l'entrée de fissures provoquée par des racines latérales ou adventives émergentes et induisent la formation des nodules. L'activation ou la répression de l'expression du gène bactérien Nod et le déclenchement de la chimiotaxie font partie de leurs fonctions dans la fixation symbiotique de l'azote entre *Rhizobium* et légumineuse (**Dharmatilake et Bauer 1992; Hassan et Mathesius 2012**).

5.3 Structure de nodosité

Le nodule compte en générale quatre zones (**Figure 10**):

- la zone « I » : correspond à une croissance méristématique responsable de l'augmentation de taille du nodule.
- La zone « II » : zone de l'invasion où se déversent les bactéries fraîchement arrivées par le canal infectieux et s'y différencient en bactéroïdes immatures.
- La zone « III » : zone de fixation, où se trouvent les cellules bactériennes fixatrices d'azote et se fait l'assimilation de l'azote. Dans la région de transition entre II et III, les cellules végétales apparaissent fortement chargées en amyloplastes (graine d'amidon) : c'est justement dans leur voisinage dans la partie distinguée de la région 3 que se fait l'assimilation de l'azote.
- La zone « IV » : zone sénescence, contient que les bactéries symbiotique, cette zone apparaît normalement au bout de cinq semaines après l'infection initiale (**Pelmont, 1994**).

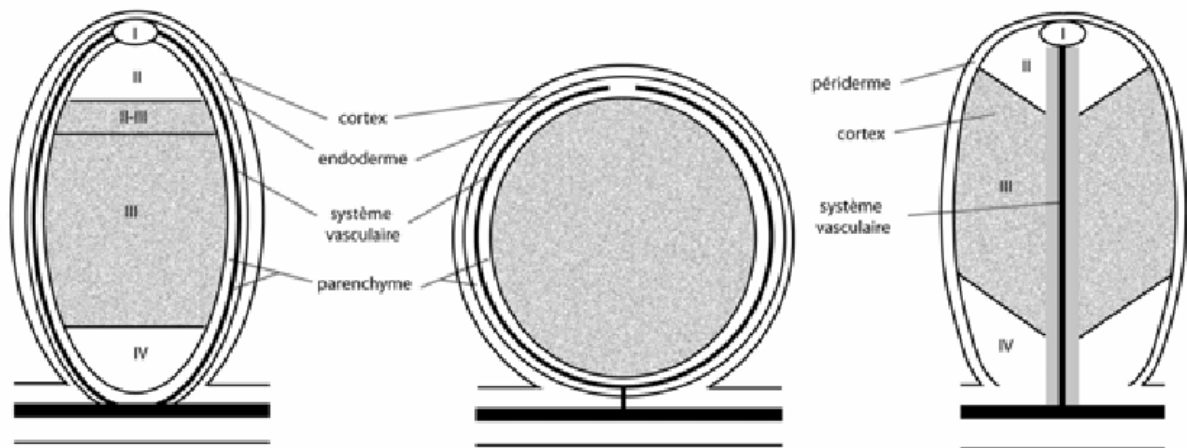


Figure 10: Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. A : Nodule de Légumineuse de type indéterminé. B: Nodule de Légumineuse de type déterminé. C : Lobe nodulaire actinorhizien. I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone II-III ; IV : zone de sénescence (**d'après Pawlowski et Bisseling, 1996**).

5.4 Mode d'infection et développement des nodules

Le mode de reconnaissance de la symbiose entre légumineuses et Rhizobium est un processus complexe. Les bactéries fixatrices d'azote, présentes à l'état saprophyte dans la rhizosphère, répondent par chimiotactisme positif aux exsudats racinaires de la plante (**Barbour et al., 1991**).

Ces bactéries sont attirées par des acides aminés, des sucres, des acides dicarboxyliques de la rhizosphère, mais aussi des flavonoïdes. L'infection des légumineuses par des bactéries s'effectue par deux modes différents : via les poils absorbants où se fait la formation de cordons d'infection, ou via des blessures occasionnées par des éléments extérieurs (**Journet, 2004**). **Figure 11.**

- **Préinfection**

L'interaction entre la plante et la bactérie commence dans la rhizosphère, la croissance des bactéries s'effectue d'une manière sélective par la plante (**Mouna, 2008**). En effet, les rhizobia sont attirés vers les poils absorbants des racines par une large gamme de substances de types flavonoïdes et isoflavonoïdes, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (**Mouna, 2008**).

Les flavonoïdes sont excrétées par le système racinaire des plantes et représentent les premiers signaux perceptibles par la microflore de la rhizosphère (**Mönchgesang et al., 2016**). L'attraction des bactéries par les racines des plantes hôtes semble d'abord impliquer un chimiotactisme positif. Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes Nod chez les Rhizobia (**Iskounen, 2012**).

- **Infection**

L'infection des racines pourrait avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (**Rasanen, 2002**). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil absorbant et en conséquence la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités continue dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité.

- **Le développement du nodule**

En parallèle et simultanément à l'infection de la racine par les bactéries se développe un nouvel organe qui formera une niche pour les bactéries : le nodule ou nodosité. Le nodule mature se compose de deux parties : les tissus internes, où l'on trouve les cellules infectées par les bactéries et où la fixation d'azote a lieu ; et les tissus externes qui assurent les échanges avec le reste de la plante et la protection des tissus internes.

Selon la terminologie proposée par Hirsch en 1992, les tissus périphériques nodulaires sont au nombre de trois : le cortex nodulaire, à l'extérieur, qui dérive de l'épiderme racinaire ; L'endoderme et le parenchyme nodulaire (ou cortex interne) (**Hirsch, 1992**). Au sein du parenchyme nodulaire se trouvent les traces vasculaires connectées au cylindre central de la racine. Ces vaisseaux périphériques assurent la nutrition du nodule et permettent l'exportation de l'azote fixé vers le reste de la plante. La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes. Elle protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (**Aouadj et Saidi Sief, 2015**).

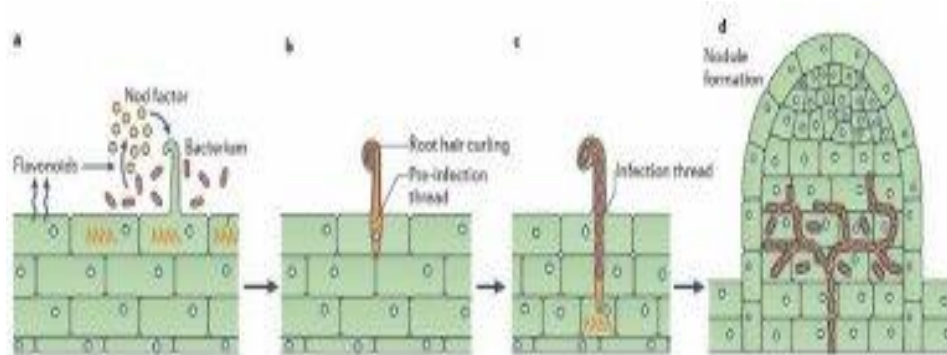


Figure 11 : Infection de légumineuses par les rhizobia (Oldroyd, 2013).

5.5 La génétique de nodulation

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de *Rhizobium*s et dans le chromosome des souches de *Bradyrhizobium*s (Raven *et al.*, 2000). De nombreux gènes bactériens interviennent dans la nodulation de la plante (gènes nod) et dans le fonctionnement du nodule avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes nif et fix) (Werner, 1992). Les gènes nod sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes nif et les gènes fix sont regroupés dans 5 régions distinctes (Crossman, 2004).

1. **Les gènes nod** : Les gènes nod ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005). Les gènes régulateurs nodD codent pour des protéines qui, en présence de signaux (de type flavonoïdes) sécrétés par la plante, activent l'expression des autres gènes nod de la bactérie ; ils sont dits gènes nod structuraux (Pelmont, 1995).
2. **Les gènes nif** : Les gènes nif ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le rhizobium libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy et Nougier, 2005).
3. **Les gènes fix** : Les gènes fix N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, fix G, H, I, S codent pour la pompe cationique, fix A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crossman, 2004). Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses (Dénarié, 2000). Ce transfert latéral des gènes de nodulations a contribué à l'évolution et à l'étendue de la capacité symbiotique (Moulin *et al.*, 2004).
4. **Les gènes de la plante hôte** : Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005). Ces nodulines sont codées par des gènes nod localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins, 2003).

5.6 Les paramètres affectant la réussite de la nodulation

Dans le bassin méditerranéen, la symbiose Rhizobium-légumineuse est une composante importante de cet agro-système vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques. En effet, cette symbiose peut, lorsqu'elle fonctionne bien, assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes et garantir une production convenable permettant ainsi aux agriculteurs d'épargner le coût des fertilisants chimiques et soulager l'environnement de leur pollution. Cependant, en Algérie ce processus naturel est affecté par plusieurs contraintes abiotiques parmi lesquels le stress hydrique, le stress salin et les variations de température (**Merabet *et al.*, 2006 ; Boulila, 2009 ; Amrani *et al.*, 2010 ; Boukhatem *et al.*, 2012**).

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: problèmes de nodulation attendue une fois que le pH tombera en dessous de 5,5 (**Bordeleau et Prévost, 1994**). L'optimum La gamme de pH pour la croissance rhizobienne se situe entre 6,0 et 7,0 (**Graham *et al.*, 1994**). Dans les sols avec un pH inférieur à 5,0, l'aluminium et le manganèse deviennent une contrainte supplémentaire qui pourrait tuer les rhizobies (**Drew *et al.*, (2012)**). Selon **Vassileva *et al.* (1997)**, pH du sol de 4,0 à 4,5 nombre extrêmement réduit de nodules, poids sec du nodule, nodule poids frais et activité nitrogénase du haricot commun. 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: contrainte majeure 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**). En effet, la croissance des rhizobiums du sol peut être affectée par le stress salin en limitant la colonisation des racines, l'inhibition des infections, la production et le fonctionnement des nodules (**Mustafakulova & Qobilov., 2020**).
- La température: La température a été signalée affectant la nodulation, la survie et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol (**Kabahuma,2013**). Selon **Drew *et al.*, (2012)**, les rhizobia sont tués dans le sol et sur les graines lorsque la température du sol dépasse 35 ° C. **Liu *et al.*, (2010)**. On donne des exemples sur La nodulation du soja qui a été nettement inhibée à des températures plus élevées (**Chibeba et al.2015**), ainsi que **Piha et Munnus (1987)** ont rapporté que les nodules de l'haricot formés à 35 ° C étaient petits et avaient une faible activité nitrogénase spécifique.

Chapitre 2:

Matériels et Méthodes

Objectif du travail:

L'objectif de ce travail est l'isolement et la caractérisation des Rhizobactéries et spécialement les bactéries de la famille des Rhizobiaceae présentes dans les nodules racinaires des légumineuses spontanées fourragères (*Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum*), récoltés sur des plantes au sein de l'université de BLIDA située dans le nord Algérien.

1. Méthodes expérimentales

1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique sur lequel nous avons travaillé est constitué de nodules récoltés à partir des racines des plantes spontanées *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum*.

Les échantillonnages de nos espèces d'étude ont été effectués au niveau de deux stations. La première (les deux *Lotus* et *Vicia sativa*) dans le champ près de faculté des sciences de la nature et de la vie (SNV) (zone A) ; La seconde (*Trifolium hybridum*) récoltée près du laboratoire de recherche au niveau de département agronomie (zone B). **Figure 12.**



A : Station N° 01 d'échantillonnage de *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides* et *Vicia sativa*.

B : Station N° 02 d'échantillonnage de *Trifolium hybridum*.

Figure 12 : Localisation des sites d'échantillonnages (Google earth, 2021).

1.2. Position systématique des échantillons:

La systématique de nos échantillons est résumée dans les tableaux N°05, 06,07 et 08.

Tableau N°05: position systématique de l'échantillon 01 (espèce *Lotus edulis*) selon **Tison et al. (2014)**.

Taxon	Echantillons
Règne	Plantae
Sous-Règne	Viridaeplantae
Infra-Règne	Streptophyta
Classe:	Equisetopsida
Sous-Classe	Magnoliidae
Ordre	Fabales
Famille:	Fabacées
Sous-Famille	Papilionoideae
Genre	<i>Lotus</i>
Espèce	<i>edulis</i>

Tableau N°06: Position systématique de l'échantillon 02 (espèce *Lotus ornithopodioides*) selon **Quezel et Santa (1962)**.

Taxon	Echantillon
Régné	Planta
Embranchement	Spermaphyta
Sous-embranchement	Magnoliophyta
Classe	Dicotylédones
Série	Caliciflorres
Ordre	Rosal
Sub-famille	Faboideae
Sous-famille	Papilionaceae
Genre	<i>Lotus</i>
Espèce	<i>Ornithopodioides</i>

Tableau N°07 : Position systématique de l'échantillon 03 (espèce *Vicia sativa*) Selon **Carcaillet (1993), Frenot et al. (2001) et Tison et al. (2014)**.

Taxon	Echantillon
Règne	Plantae
Sous-Règne	Viridaeplantae
Classe	Equisetopsida
Clade	Tracheophyta
Sous-Classe	Magnoliidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-Famille	Papilionoideae
Genre	<i>Vicia</i>
Espèce	<i>Sativa</i>

Tableau N°08 : Position systématique de l'échantillon 04 (espèce *Trifolium hybridum*) selon **Tison et al. (2014)**.

Taxon	Echantillon
Régne	Plantae
Sous-régne	Viridaeplantae
Classe	Equisetopsida
Clade	Spermatophyta
Sous-Classe	Magnoliidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Papilionoideae
Genre	<i>Trifolium.</i>
Espèce	<i>Hybridum</i>

- **Les figures suivantes sont des photos prises au cours de notre étude.**

1.3. Les légumineuses étudiées :

Les espèces de légumineuses spontanées récoltées sont au nombre de quatre, il s'agit de *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioïdes*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum*. **(Figure 13)**.

L'observation du système racinaire des plants récoltés montre un taux de nodulation important (avec une moyenne de 30 nodules/plant) pour les deux espèces *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum* qui pourrait s'expliquer par la nature et la composition des sols de cette région. Concernant les deux espèces de lotus (*L. edulis* et *L. ornithopodioïdes*) nous avons observé un taux de nodulation faible par rapport aux autres espèces étudiées (avec une moyenne de 10 nodules /plant).



Figure 13 : Échantillonnages de nos espèces d'étude après la collecte.

1.4. Collecte des nodules :

La sélection et l'échantillonnage des nodules doivent être réalisés durant une période bien précise, période où la plante est en pleine activité. La récolte est effectuée au printemps durant les mois de Mars et Avril (l'échantillonnage est fait durant l'année 2021) quant la terre est sèche. A cette période de l'année les nodules sont bien développées et visibles au niveau des racines ; leur couleur rougeâtre indiquent la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote. Dans notre étude nous avons collecté 4 plantes du genre *Lotus* (02 *L. edulis* et 02 *L. ornithopodiöide*), 03 espèces *Trifolium hybridum* et 01 du l'espèce *Vicia sativa*.

La collecte est réalisée suivant la méthode de **Vincent (1970) et Beck et al. (1993)** :

- Réaliser une creusée d'environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire;
- Retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ;
- Couper les racines, les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.

- Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachées à 1à2mm du site d'attache, et enfin séchées avec du papier filtre avant leur conservation. (**Figure 14 et 15**).



Figure 14: Echantillon de nodules de l'espèce *Vicia sativa* (après un rinçage).



Figure 15 : Détachement des nodules.

1.5. Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par **Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994)**. Elle consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du CaCl₂ (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite, mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules (**Figure 16**).

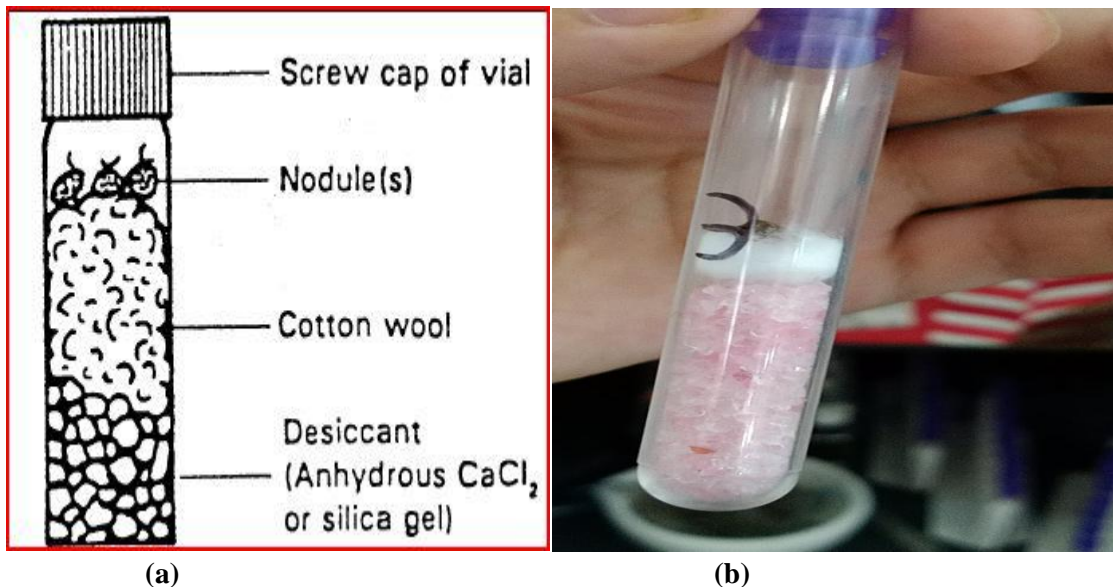


Figure 16: (a) Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).
 (b) Tubes utilisés pour la conservation des nodules dans notre étude.

1.6. Isolement des souches à partir des nodules

La technique d'isolement des bactéries est celle décrit par Vincent(1970) et Somasegaran et Hoben (1985, 1994).

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que ceux qui sont conservés par dessiccation sont réhydratés en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C , puis pendant 1h à la température ambiante.

Dans notre étude nous avons utilisé les deux méthodes :

Les nodules des deux espèces de *Lotus et Vicia sativa* ont été à la technique de conservation par dessiccation.

Les nodules d'espèce *Trifolium hybridum* –frais- ont, quant à eux, été lavés et utilisés directement.

1.6.1. Stérilisation des nodules :

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes , puis transférés rapidement dans le Chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g HgCl_2 +5ml HCl +1L d'eau distillée) pendant 3 minutes . Il est ensuite effectué un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile puis laissés gonfler après le 10^{ème} rinçage avant de procéder à leur écrasement. (Figure 17).



Figure 17 : Stérilisation des nodules.

2.6.2. Ecrasement des nodules :

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile puis disposé chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen. (**Figure 18**).



Figure 18 : Ecrasement des nodules à l'aide d'une pince stérilisée.

2.6.3. Isolement des souches

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, prélever la suspension de nodules et l'étaler selon la technique des quatre cadrons (**Vincent, 1970**) sur gélose coulée en boîte (YMA+RC et GPA) **dont la composition est en annexe 1**, puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures (**Figure 19**).

Avant l'écrasement et pour confirmer la stérilité des nodules on va étaler le nodule tel quel immédiatement sur des boîtes.

Toute cette manipulation doit être effectuée sous des conditions microbiologiquement contrôlées, en milieux stériles à proximité du bec Bunsen et sous une hotte à flux laminaire.

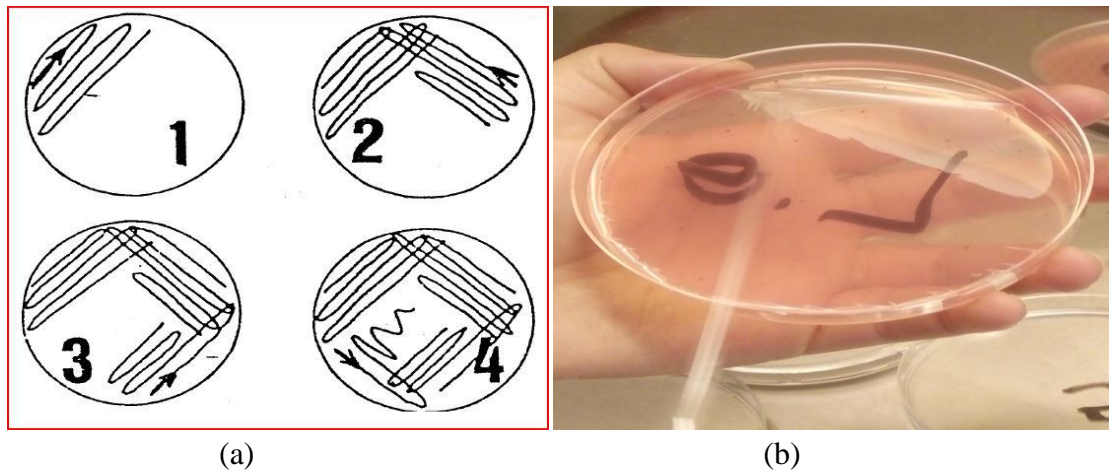


Figure 19 : (a). Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).
 (b). Ensemencement par la technique des quatre cadrans sur le milieu YMA+RC à l'aide d'une pipette pasteur.

2. Caractères cultureux des isolats :

2.1. Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants : (voire Annexe 01).
Figure 20.

-Un milieu liquide: YMB (yeast Mannitol Broth) (Vincent, 1970).

-Des milieux solides:

*YMA (yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970);

*YMA+RC (yeast Mannitol Agar + Rouge Congo) (Vincent, 1970).

Rouge Congo permet de détecter d'éventuelles contaminations. En effet, en présence de rouge Congo, les colonies de Rhizobia n'absorbant généralement pas ce colorant, forment des colonies blanchâtres, rosées ou orangées ; alors que les contaminants forment des colonies rouges en raison de la forte absorption de rouge Congo (Vincent, 1970).

*YMA+BTB (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol). (Somasegaran et Hoben, 1994).

*GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol) Vincent, 1970.

Après préparation, ces milieux sont ensuite autoclavés à 120°C pendant 20 minutes, et finalement coulés dans des boîtes de Pétri (Figure 21).



(a)

(b)

Figure 20 : Les milieux de culture utilisés dans notre étude.

(a). représente le milieu solide: YMA+RC (yeast Mannitol Agar + Rouge Congo) et GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol).
 (b). représente le milieu solide : YMA+BTB (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).



Figure 21 : Ecoulement les milieux de culture dans les boites de pétri stérile.

2.2. Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994**), des repiquages réguliers jusqu'à obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis les placer dans un bain-marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C. Le bouillon étant trouble, l'ensemencement se fait Sur le milieu YMA+RC.

Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologiques sont enfin réalisés.

2.3. Examen morphologique des isolats

Après purification des bactéries selon la technique de **Vincent (1970)** et incubation à 28°C pendant 4 à 5 jours, une analyse visuelle de l'aspect des colonies a été faite comme celle décrite par **Jordan (1982)**. Les critères choisis sont relatifs à la forme, la taille et la consistance des colonies.

2.4. Examen microscopique (Coloration de Gram):

Dans notre étude, nous avons effectué la coloration de Gram. Cette technique permet effectivement de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts (Gram+ et Gram -). Cette division est principalement liée à une différence de structure chimique des parois cellulaires des bactéries. Elle permet en générale d'apprécier la pureté des souches avant toute identification (**Ritsema et al., 1996; Delarras, 2014**).

Le test Gram a été effectué sur toutes les souches cultivées sur un milieu YMB et incubées à 28°C après l'apparition d'un trouble.

La technique consiste à :

- Préparer un frottis sur lame de verre ;
- Fixer un frottis à la chaleur au bec Bunsen ;
- Recouvrir la lame par un colorant basique (le violet de gentiane) et laisser agir pendant 1minute ;
- Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes ;
- Rincer à l'alcool ;
- Laver soigneusement avec l'eau pour arrêter l'action de l'alcool ;
- Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir 1minute ;
- Laver à l'eau distillée ;
- Egoutter la lame sur du papier absorbant ;
- Observer sous microscope optique (Grossissement 10*100) en ajoutant une goutte d'huile à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries «Gram +» apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries «Gram -» sont colorées en rose ou rouge (**Delarras, 2014**).

2.5. Examen de mobilité :

Le Mannitol mobilité est un milieu de culture caractérisé par l'utilisation de mannitol et permet la mise en évidence ou non de la mobilité bactérienne.

La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de PH, le rouge de phénol. L'utilisation de mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de PH à sa teinte acide (jaune orangé).

Par une anse de platine qui contient une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité (**Annexe 01**) qui est Incubé pendant 24h, puis on procède à l'observation.

Si la bactérie fermente le mannitol, la réaction est dite mannitol positif (+), par contre si le milieu vire vers le rouge, pas de fermentation du Mannitol, la réaction est dite Mannitol négatif (-).

3. Caractéristiques métaboliques des isolats

Dans le premier cas, il s'agit de vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente sur le milieu YMA contenant le Bleu de Bromothymol ; de tester l'absorption du Rouge Congo sur milieu YMA par les isolats et tester aussi la croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA).

Dans le second cas, la recherche de certaines enzymes respiratoire.

3.1. Vitesse de croissance

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...). Pour cela on cultive les isolats sur milieu YMA+Bleu de Bromothymol (**Figure 22**).

L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).



Figure 22 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans sur le milieu YMA+Bleu de Bromothymol.

3.2. Test d'absorption du colorant rouge Congo sur milieu YEMA

Ce milieu permet de mettre en évidence la morphologie et les caractéristiques des colonies (couleur, texture, etc...) ainsi que de vérifier la pureté des souches isolées. Les rhizobia absorbent peu ou pas le RC donc ce milieu permet de sélectionner les bactéries recherchées (**Somasegaran et Hoben 1985**).

Procéder à un ensemencement des boîtes de Pétri par des stries à la surface suivant la technique des quatre cadrans puis incubé à une température de 30°C (**Somasegaran et Hoben 1985**).

Les colonies qui absorbent fortement le colorant sont des bactéries contaminants. Par contre les colonies qui absorbent peu ou faiblement le colorant sont des bactéries suspectées des rhizobia.

3.3. Test de croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)

Le Glucose Peptone Agar (GPA) est un milieu nutritif très riche qui favorise le développement de grand nombre des bactéries comme les entérobactéries et les *Agrobacterium*.

Ensemencer les isolats par stries sur des boîtes contenant le GPA additionné de BCP (**Figure 23**) et incuber à 30°C. À partir de 24 à 72 heures il y aura une croissance avec un virage de couleur du milieu au jaune qui signifie présence des bactéries non rhizobienne.

Et si il n'y a pas de croissance (ou présence de croissance faible) sans virage au jaune, les bactéries appartiennent probablement au rhizobia.



Figure 23: Ensemencement des isolats par la technique des quatre cadrans sur le milieu Glucose Peptone Agar (GPA).

3.4. Etude des enzymes respiratoires

3.4.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Cette enzyme permet la décomposition de l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau et oxygène moléculaire.

Une suspension bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée. La production des bulles d'air révèle la présence d'une catalase (**Marchall, 1982**) **Figure 24**.



Figure 24 : suspension bactérienne mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée dans une lame stérile.

3.4.2. Recherche de l'oxydase: (Indophenol oxydase)

Le test de l'oxydase est basé sur une éventuelle production d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome (**Vezina, et Lacroix, 2000**).

Un disque pour dosage de l'oxydase est imbibé d'eau stérile et mis sur une lame stérile en contact avec les bactéries prélevées d'une colonie à identifier.

Les bactéries oxydases positives dégradent le substrat sur le disque et donnent une coloration violette foncée après quelques secondes (**Marchall, 1982**).

4. Conservation des souches

Avant de conserver les souches elles sontensemencées dans des tubes contenant 9ml de bouillon YMB dans le but d'enrichir la culture pendant 24h dans un bain-marie avec agitation à une température de 30°C.

Le choix d'un procédé assurant la parfaite stabilité des micro-organismes et leur survie prolongée dépend :

- De la nature des micro-organismes à conserver.
- Des besoins du laboratoire et de ses moyens.

Il existe plusieurs techniques de conservation. Deux méthodes sont utilisées :

-La première est la conservation sur YMA additionnée de 1 à 3g/l de CaCO_3 comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés qu'onensemence de cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 30°C pendant 72 heures puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (**Vincent ,1970**).

-La deuxième méthode, celle que nous avons adoptée dans notre expérimentation, est la conservation sur YMA additionné 30% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes d'Eppendorf inoculées par piqûre centrale, puis incubées en temps de 24h à 48h à 30°C , puis mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à -20°C. (**Krasova-Wade, 2003**).

Chapitre 3 :

Résultats et discussions

L'intérêt de notre travail réside dans l'association, si particulière, qu'entretiennent les légumineuses (*Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioïdes*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum*) avec les micro-organismes telluriques et spécialement les bactéries de la famille des Rhizobiaceae.

Le complexe légumineuse-rhizobia aboutit à la néoformation de nodosités où la plante héberge les bactéries via des processus non encore entièrement élucidés. Les rhizobia fixent l'azote atmosphérique dans certaines conditions et le rend assimilable par la plante.

Notre choix des espèces a été influencé aussi par leurs intérêts agronomiques et fourragers précédemment décrits (**voire la bibliographie**).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés particulièrement à la caractérisation de ces bactéries.

Les ébauches et/ou études relatives aux :

- Fait que la plante hôte reconnaît la bactérie comme propre à elle ;
- Mécanismes qui empêchent cette dernière de se défendre vis-à-vis de la bactérie ;
- Propriétés qu'ont certains rhizobia à dépolluer les sols ;

N'ont pu être finalisées faute combinée des moyens disponibles, du temps et des règles et procédures liées à ces travaux.

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les rhizobiums, la base de la description formelle. Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (**Baldani et Baldani, 2005**).

En dehors de ces informations dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphasique, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux.

Notre mode opératoire a été choisi selon les méthodes préconisées par **Vincent (1970) et Somasegaram et Hoben (1994)**.

1. Caractéristiques des échantillons

Les quatre espèces de plantes spontanées utilisées dans notre étude, le *Lotus edulis*, le *Lotus ornithopodioïdes*, le *Vicia sativa* et le *Trifolium hybridum* présentent un nombre suffisant de caractères permettant d'identifier les genres grâce à leurs appareils végétatifs, feuilles, tiges, et surtout les fleurs. A maturité, les fruits (gousses) nous ont permis de caractériser les espèces.

Les caractères distinctifs établis sur une description propre qui rejoint celle de Quezel et Santa 1962 et sont notés dans les **tableaux N°09, 10, 11 et 12**.

Tableau N°09 : Caractéristiques de *L. edulis* des sites d'échantillonnages (**Quezel et santa 1962**).

Nom scientifique	Nom commun	Tiges et racines	Feuilles et folioles	Fleurs	Gousses et graines
<i>Lotus edulis</i> (Figure 4 et 16)	Peratzoui Ou Lotier comestible	Plante annuelle de 10-40 cm, peu velue, ascendante ou diffuse Etalé horizontalement, lâchement et sans ordre.	composées imparipennées, poilues, vert franc ; folioles obovales-oblongues. glaucescentes. Stipules ovales.	Fleurs portées par des pédicelles plus longs que les feuilles adjacentes	gousse de 20-30 mm, très épaisse, charnue, à la fin coriace, cylindrique, arquée, profondément canaliculée au bord supérieur, à 2 loges, à graines grosses.

Tableau N°10 : Caractéristiques de *L. ornithopodioides* des sites d'échantillonnages (**Guezet et Santa, 1962**).

Nom scientifique	Nom commun	Tiges et racines	Feuilles et folioles	Fleurs	Gousses et graines
<i>Lotus ornithopodioides</i> (Figure 5 et 16)	Lotier à pied d'oiseau	Plante annuelle suffrutescente. Rameuse. Pubescente. Racine pivotante pourvue de nodosité.	Feuilles trifoliées à folioles entières. Stipules Ovale, 03 feuilles florales	Fleurs jaunes regroupées en 03 à 05	Arquées, stipitées à graine Saillantes, Rapprochées en faisceaux

Tableau N°11 : Caractéristiques de *V. sativa* des sites d'échantillonnages (**Quezel et santa 1962**).

Nom scientifique	Nom commun	Tiges et racines	Feuilles et folioles	Fleurs	Gousses et graines
<i>Vicia sativa</i> (Figure 6, 7 et 16)	La vesce commune	Plante annuelle de 30-80 cm, pubescente, grimpante.	feuilles à 5-7 paires de folioles larges, tronquées ou échancrées.	fleurs grandes (2-3 cm), à étendard violacé avec ailes d'un pourpre brun, géminées, rarement solitaires, subsessiles.	gousse de 40-60 mm sur 6-10, large, comprimée, bosselée, non stipitée, dressée ou étalée, pubérulente, d'un fauve pâle à la maturité. graines grosses, subglobuleuses, séparées par du tissu cellulaire.

Tableau N°12 : Caractéristiques de *T. hybridum* des sites d'échantillonnages (**Tison et al. 2014**).

Nom scientifique	Nom commun	Tiges et racines	Feuilles et folioles	Fleurs	Gousses et graines
<i>Trifolium hybridum</i> (Figure 8 et 16)	trèfle hybride	plante annuelle ou bisannuelle de 25 à 60 cm, à tige glabre, ascendante et peu ramifiée..	Alternes. Trifoliolées, à folioles étroites, émoussées, dentées, 1-2 cm de long. Stipules unies au pétiole.	Corolle irrégulière (zygomorphe), 7-12 mm de long. Cinq pétales de blanc à rougeâtre, puis marron	Cosse indéhiscente incluse dans le calice.

2. Les isolats des nodules racinaires

L'isolement des Rhizobactéries présentes dans les nodules racinaires de *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum* de la région de Blida est réalisé sur le milieu de culture sélectif YEMA (**Somasegaran et Hoben 1995**) additionné du colorant rouge Congo (RC).

Les colonies de rhizobia apparaissent au bout de 72 heures d'incubation, elles sont de couleur rosâtre due au fait qu'elles absorbent très peu ou pas le rouge Congo.

Un total de 67 isolats a été obtenu ensemencés sur milieu YEMA additionné de rouge Congo.

Le nombre total de nodules utilisés pour l'isolement des rhizobia est de 102 dont 15 nodules de *L. edulis*, 19 de *L. ornithopodioides*, 30 de *V. sativa* 38 de *T. hybridum*. (**Tableau N°13**).

Tableau N°13: Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses utilisées.

Légumineuses spontanées	Nombre de nodule	Nombre d'isolat
<i>Lotus edulis</i>	15	17
<i>Lotus ornithopodioïdes</i>	19	20
<i>Visia sativa</i>	30	20
<i>Trifolium hybridum</i>	38	10
Totale	102	67

Après repiquages des isolats nous avons obtenu 10 isolats (3 isolats de l'espèce *V sativa* et 3 *T hybridum*, 2 isolats de l'espèce *L edulis* et 2 *L ornithopodioïdes*).

Les colonies de l'ensemble des isolats absorbent peu le rouge Congo. Les autres colonies contaminants issues de l'espèce *L. edulis* sont fortement colorées et acidifient rapidement le milieu Glucose-Peptide-Agar en présence du Pourpre de Bromocrésol.

3. Caractères morphologiques et culturels des isolats

3.1. Caractérisation culturelle

Le tableau N°14 résume l'ensemble des résultats de la caractérisation culturelle des souches étudiées.

Ces résultats montrent que toutes les souches bactériennes cultivées sur milieu YMA à 30°C forment des colonies de couleur blanche, de taille qui varie de 1 à 4 mm.

Tableau N°14 : Résumé des caractères cultureux des dix (10) isolats après observation à l'œil.

Caractères	Diamètre de colonie	Forme	Surface	Hauteur	Consistance	Caractères optiques	Couleur
Isolats							
LE 1	1 mm	arrondie circulaire	Lisse	légèrement bombée	Visqueuse	Opaque	Blanche
LE 2	1 mm	arrondie circulaire	Lisse	légèrement bombée	Visqueuse	Opaque	Blanche
LO 1	2 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
LO 2	3 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
VS 1	4 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
VS 2	1 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
VS 3	2 mm	arrondie circulaire	Lisse	légèrement bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
TH 1	2 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
TH 2	2 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche
TH 3	4 mm	arrondie circulaire	Lisse	Bombée	Visqueuse	Translucides	Blanche

LE : Isolats de l'espèce *L. edulis*.

LO : Isolats de l'espèce *L. ornithopodioides*.

VS : Isolats de l'espèce *Vicia sativa*

TH : Isolats de l'espèce *Trifolium hybridum*

3.2. Temps de croissance

Le temps de croissance des rhizobia cultivés sur YEMA est un bon indice de sélection. Il permet de différencier les rhizobia à croissance rapide (entre 48 et 72 heures) et les rhizobia à croissance lente (plus de 4 jours) (**Somasegaran et Hoben 1985**). Les isolats ont été purifiés sur milieu YEMA additionné de RC, et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°15.

Nous remarquons que les isolats obtenus (de *L. edulis*, *L. ornithopodioides* et *V. sativa*) ont un temps de croissance compris entre 48 et 72 heures, donc ils sont classés dans la catégorie des Rhizobactéries à croissance rapide. Par contre les isolats obtenus (de *T. hybridum*) ont un temps de croissance très lent (plus de 5 jours).

Tableau N°15: Temps de croissance des souches isolées.

Plantes spontanées	Nombre des isolats	Temps de croissance
<i>L. edulis</i>	02 Rhizobactérie	72 heures croissance rapide
<i>L. ornithopodioides</i>	02 Rhizobia	48 heures croissance rapide
<i>V. sativa</i>	03 Rhizobia	72 heures croissance rapide
<i>T. hybridum</i>	03 Rhizobia	> 5 jours croissance très lente

3.3. Croissance sur YMA+ RC

L'ensemencement du broyat nodulaire sur le milieu YMA+RC montre que les souches présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo. Certaines souches absorbent peu le rouge Congo, mais la plupart des souches de rhizobia n'ont pas la capacité d'absorber le colorant. Cependant, il existe des exceptions à ce comportement généralisé, les colonies sont sous forme ronde de couleur rose claire visqueuse.

L'ensemble des colonies isolées à partir des quatre espèces spontanées ont un contour régulier, et sont plus au moins bombées. Ce qui est en accord avec les caractères morphologiques déjà décrit pour les rhizobia dans la littérature (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). **Figure 25.**

Les bactéries appartenant à la famille des Rhizobiacées ont la particularité de produire des acides en présence de mannitol comme une seule source de carbone dans le milieu (Samasegaran et Hoben, 1994). Cette acidification est mise en évidence par l'utilisation d'un indicateur de pH qui est dans notre cas le Rouge Congo. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les colonies obtenues à partir des échantillons utilisés appartiennent à des bactéries de la famille des Rhizobiacées.

La croissance des isolats sur le milieu YMA+RC est considéré parmi les principaux critères phénotypiques dans la caractérisation des rhizobia (Ausmees *et al.*, 1999 ; Torche *et al.*, 2010).

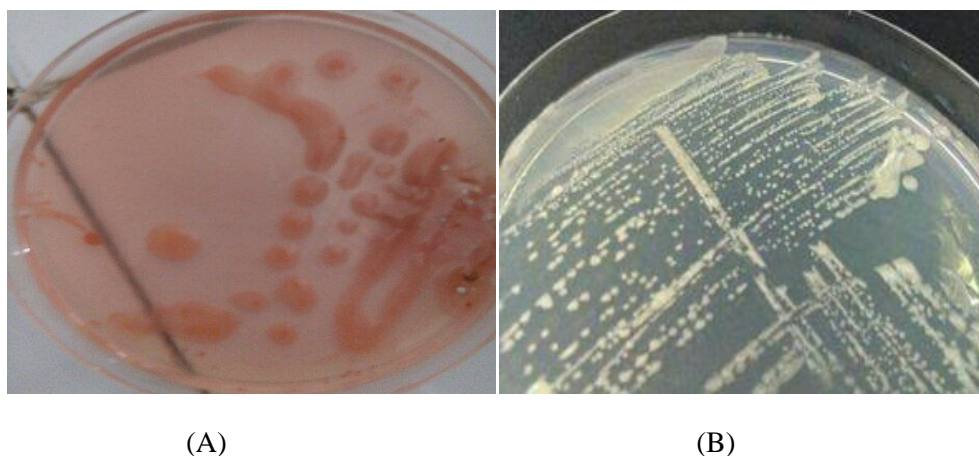


Figure 25 : Aspect de colonies sur les milieux de cultures. A: YMA+ RC ; B: YMA

3.4. Croissance sur GPA+BCP

La fermentation du glucose est un critère de différenciation utilisé pour la discrimination entre les espèces bactériennes qui n'appartiennent pas à la famille des entérobactéries. Cette fermentation se manifeste par la production d'acide entraînant la modification de la couleur de l'indicateur de pH utilisé qui est dans notre cas le pourpre de bromocrésol.

Selon Beck *et al.* (1993), Ce milieu est généralement utilisé comme milieu de purification pour les Rhizobia, qui sont caractérisés par aucun changement du pH, contrairement au contaminant qui change la couleur du milieu du violacé en jaune après 24 à 48 heures. Le virage de couleur vers le jaune indique une acidification.

Nous avons observé une acidification du milieu plus ou moins marquée chez les isolats d'espèces 01 (*Lotus edulis*), et le reste des isolats des espèces (*Lotus ornithopodioides*, *Vicia sativa*)

présentent une alcalinisation du milieu (aucun changement du pH), c'est-à-dire les bactéries appartenantes probablement au rhizobia (**Figure 26**).

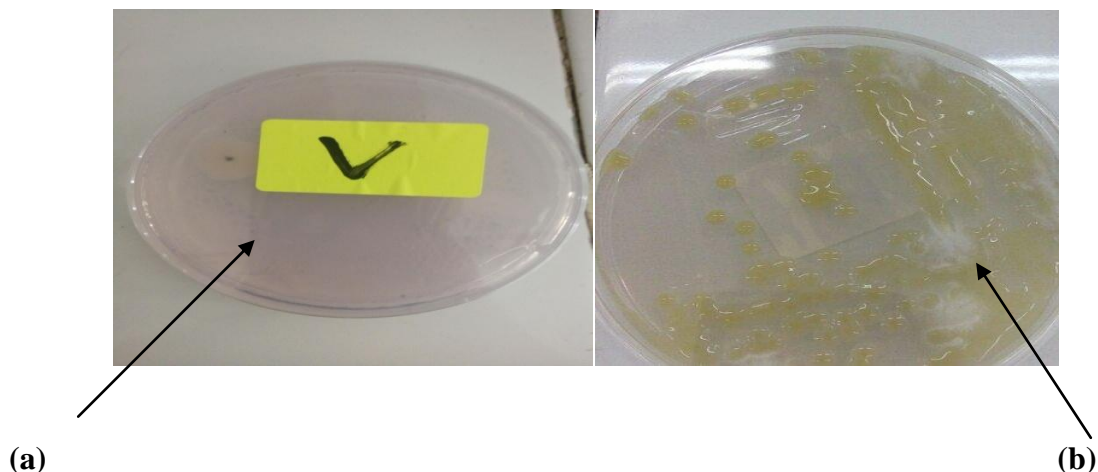


Figure 26 : Croissance sur GPA+BCP:

- (a) Alcalinisation sur milieu GPA+BCP des isolats des autres espèces spontanées appartenant au genre rhizobia (*L. ornithopodioides*, *V. sativa*).
- (b) Acidification sur milieu GPA+ BCP des isolats de l'espèce *L. edulis* (virage du milieu en jaune).

3.5. Résultat de la coloration de Gram

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, la coloration de Gram est utilisée par visualisation des bactéries au microscope optique.

L'observation au microscope optique des frottis a permis d'observer des coccobacilles à Gram positive de taille différente (Espèce 01), des courts bâtonnets roses à Gram négative (Espèce 02) et des bâtonnets à Gram négative (Espèce 03) compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (**Figure 27**).

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à l'aspect microscopique suggèrent que les isolats de l'espèce *L. ornithopodioides* et *V. sativa* ont la même description des rhizobia.

Par contre, les résultats obtenus sur l'aspect microscopique des isolats des espèces *L. edulis* n'ont pas été conformes à nos attentes et ont suscité des interrogations :

- Contaminations ?
- S'agit il d'autres bactéries rhizosphérique comme *Bacillus* et *Frankia* ? dans ce cas, d'autres tests, hors notre objet, pourraient le révéler.




		
Espèce 01 : coccobacilles à Gram positive	Espèce 02 : Court Bâtonnets à Gram négative	Espèce 03 : Bâtonnets à Gram négative

Figure 27 : Résultat de la coloration de Gram des trois espèces (01 ; *Lotus edulis*, 02 ; *Lotus ornithopodioides*, 03 ; *Vicia sativa*).

Tableau 16: Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram.

Les isolats	Le Gram	La forme
Espèces 01	Positive	Coccobacilles
Espèces 02	Négative	Court Bâtonnets
Espèces 03	Négative	Bâtonnets
Espèces 04 ⁽¹⁾	Indeterminée	Indeterminée

(1) – Croissance très lente

3.6. Examen de mobilité

La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la pique centrale. Les germes immobiles ne poussent qu'au niveau de la pique central alors que les germes mobiles diffusent dans la gélose.

Notre travail d'ensemencement sur milieu Mannitol mobilité montre que les bactéries de nos espèces spontanées sont mobiles (l'observation par exposition à la lumière montre que les colonies bactérienne ont quitté le centre de la pique) et acidifient le milieu (virage de couleur du rouge au jaune orangé), Ce sont , très probablement, des Rhizobia (**Figure 28 et 29**).

L'observation des isolats à l'état frais confirme leur mobilité.



Figure 28 : Le milieu Mannitol mobilité avant l'ensemencement.



Figure 29 : Mobilité des souches sur le milieu Mannitol mobilité (virage de la couleur du rouge à jaune orangé).

4. Caractérisation métabolique des isolats

4.1. Mesure de la vitesse de croissance

En fait, le Bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7.6. Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (**Jordan, 1984. Beck et al., 1993., Pagano, 2008**).

Les isolats bactériens qui appartiennent aux espèces 02 (*L. ornithopodioides*,) ont modifié le pH sur milieu YMA+BTB après 48 à 72 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification du milieu dans les boîtes, ce qui indique que ces bactéries présentent une croissance rapide (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*). Par contre nos isolats qui appartiennent aux deux

espèces 01 et 03 ont donné une réaction alcaline donc c'est des bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*) **Figure 30**.

Menna et al (2006) ont rapporté que les souches testées de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* ont pu acidifier le milieu YMA, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions alcalines.



Figure 30 : résultats mesure vitesse de croissance

(a) Isolât à croissance rapide sur milieu YMA+BTB (72 heures).

(b) Isolât à croissance lente sur milieu YMA+BTB (> 72 heures).

Tableau 17: Résultats d'absorption de RC ; croissance sur milieu GPA et acidification ou alcalinisation (BBT).

Les isolats des plantes spontanées	Absorption du colorant (YEMA additionné de rouge Congo)	Croissance sur milieu GPA	Acidification ou alcalinisation (YEMA additionné de BBT)
Isolat 01	Peu d'absorption	Croissance légère	Légère alcalinisation
Isolat 02	Pas d'absorption	Pas de croissance	Forte acidification
Isolat 03	Pas d'absorption	Pas de croissance	Légère acidification
Isolat 04 ⁽¹⁾	Pas d'absorption	Indeterminée	Indeterminée

(1) Croissance tres lente

4.2. Caractérisation des enzymes respiratoires

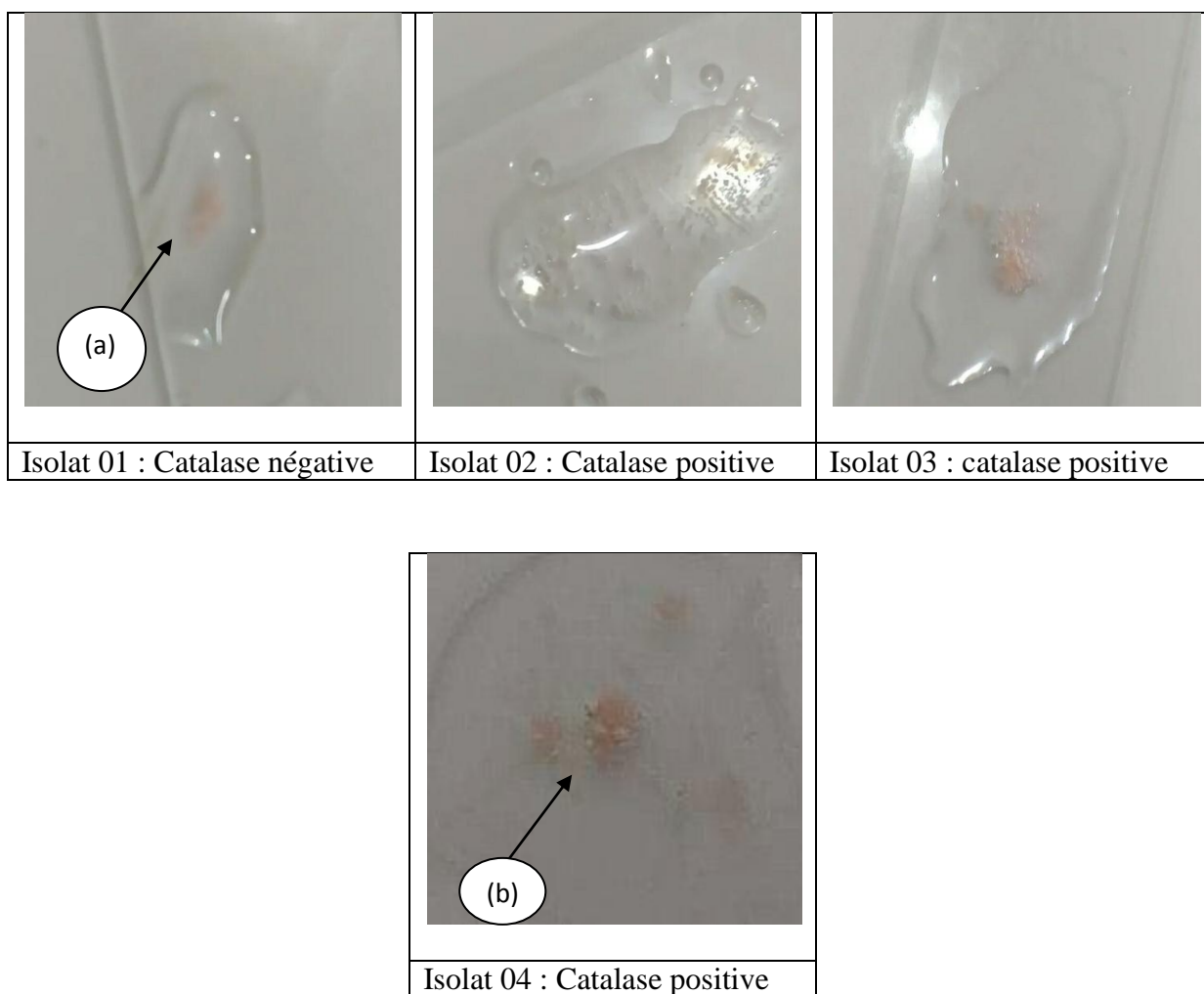
Pour caractériser une bactérie, il est préférable de connaître son type respiratoire. On trouve la catalase chez tous les organismes aérobies. C'est un cytochrome appartenant à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes.

Le test de la catalase et oxydase sont effectués pour les isolats des quatre espèces

4.2.1. Recherche de la catalase

Un test de la catalase jugé comme étant positif est observable si des bulles d'air apparaissent après contact des bactéries avec le peroxyde d'oxygénée. Dans le cas contraire, un test négatif ne permet pas de distinguer de réactions provoquant le dégagement d'oxygène.

Nos isolats présentent une réponse nettement positive à ce test, puisque des bulles d'air sont observables dans la goutte de peroxyde ajoutée, c'est-à-dire qu'il y a un dégagement d'oxygène gazeux issu de la dégradation de l'eau oxygénée. Les caractères ainsi obtenus sont ceux des rhizobia ; en effet **Jordan (1984)** rapporte que les rhizobia sont des bactéries à catalase positive et Gram négatif. Sauf les isolats de l'espèce *L. edulis* ont présenté une réponse négative. (**Figure 31**).



(a) : Catalase négative.

(b) : Catalase positive.

Figure 31 : les résultats du teste catalase.

Isolat 01 : représente des bactéries nodulaire du l'espèce *L. edulis*.

Isolat 02 : représente des bactéries nodulaire du l'espèce *L. ornithopodioides*.

Isolat 03 : représente des bactéries nodulaire du l'espèce *V. sativa*.

Isolat 04 : représente des bactéries nodulaire du l'espèce *T. hybridum*.

4.2.2. Recherche d'oxydase

Le terme d'oxydase désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. On dit qu'une bactérie est oxydase + si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylène diamine en semi-quinone (rose violacé).

La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique cytochrome-oxydase. Certains bactériologistes préfèrent parler de cytochrome-oxydase plutôt que d'oxydase.

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries, un disque est placé sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase+ et elle possède le cytochrome oxydase, les résultats ont montré que tous nos isolats des quatre espèces possèdent le cytochrome oxydase (**Figure 32**).

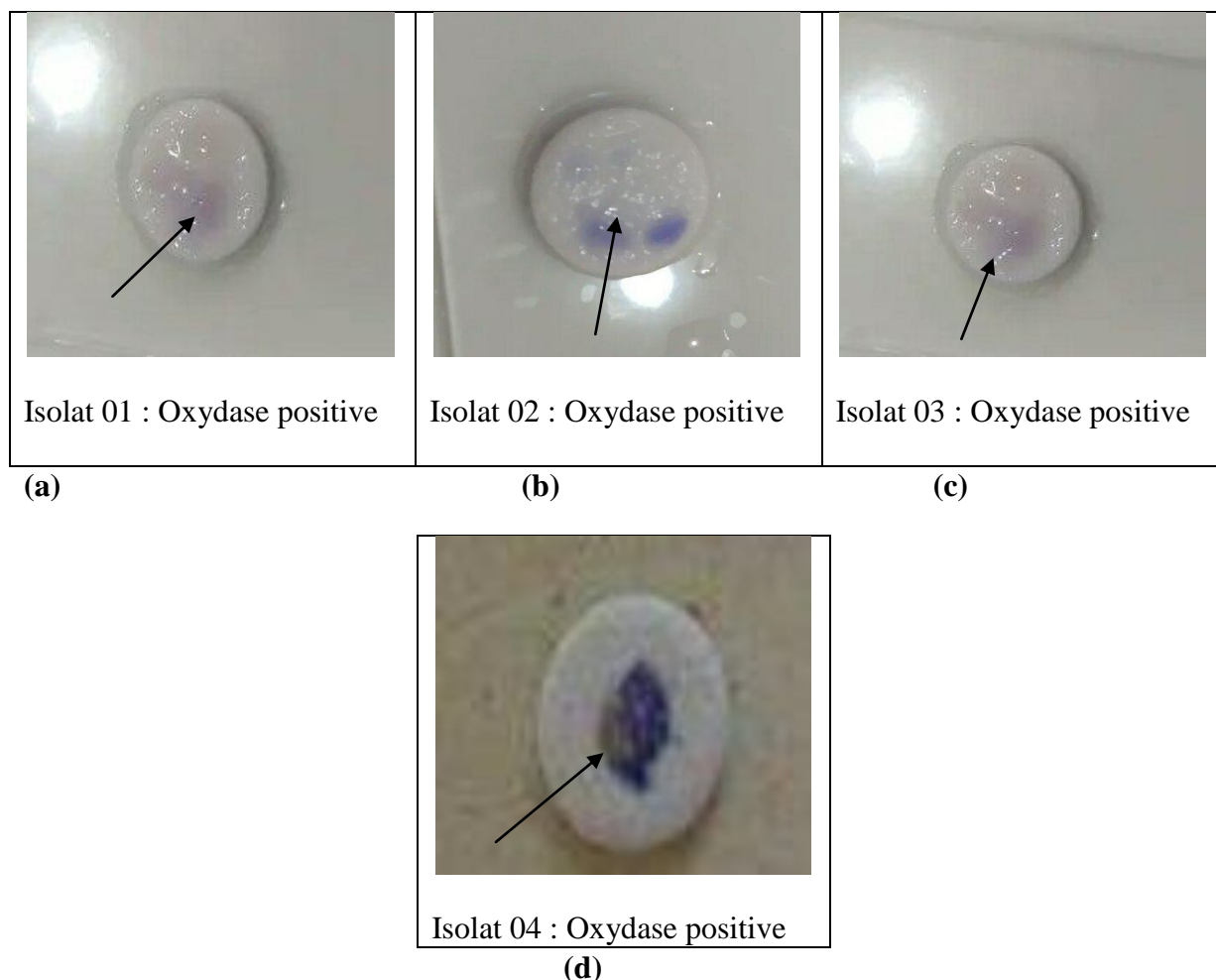


Figure 32 : les résultats du teste oxydase

- (a) : Oxydase positive des isolats de l'espèce *L. edulis*
- (b) : Oxydase positive des isolats de l'espèce *L. ornithopodioides*
- (c) : Oxydase positive des isolats de l'espèce *V.sativa*
- (d) : Oxydase positive des isolats de l'espèce *T.hybridum*

Le tableau N°19, résume les résultats des tests de catalase et de l'oxydase pour l'ensemble des isolats des quatre espèces spontanées, nous avons observé trois catalases positives pour les isolats qui appartiennent aux espèces *L. ornithopodioïdes*, *V. sativa* et *T. hybridum*, et une catalase négative pour l'isolat de l'espèce *L. edulis*, et oxydase positive pour tous les isolats.

Tableau N°18: Résultats du test de la catalase et de l'oxydase pour les isolats des quatre espèces.

Les isolats des espèces végétales spontanées	Catalase	Oxydase
Isolat 01	Négative	Positive
Isolat 02	Positive	Positive
Isolat 03	Positive	Positive
Isolat 04	Positive	Positive

Le tableau N°19 est un récapitulatif de l'ensemble des tests remises

Tableau N°19: Caractéristiques culturaux des rhizobia isolée des 4 espèces fourragères

Bactéries	Nombre d'isolats	Croissance sur YMA+RC	Croissance sur GPA+B CP	Coloration de Gram	Examen de mobilité	croissance sur milieu YMA+BTB	Test catalase	Test oxydase
Isolat 1 : (<i>L. edulis</i>) <i>Rhizobactéries</i>	02	+-	+	+	+	C.L > 72 heures	-	+
Isolat 2 : (<i>L. ornithopodioïdes</i>) <i>Rhizobium Mesorhizobium Sinorhizobium</i>	02	-	-	-	+	C.R 72 heures	+	+
Isolat 3 : (<i>V. sativa</i>) <i>Bradirhizobium</i>	03	-	-	-	+	C.L > 72 heures	+	+
Isolat 4 : (<i>T. hybridum</i>) <i>Bradirhizobium</i>	03	-	0	0	+	0	+	+

Croissance sur YMA+ RC : (-) pas d'absorption, (+-) : Peu d'absorption.
Croissance sur GPA+BCP ; (+) acidification du milieu, (-) alcalinisation du milieu.
Coloration de Gram ; (+) Gram positive, (-) Gram négative
Examen de mobilité ; (+) bactéries mobiles.
Croissance sur milieu YMA+BTB ; C.L Croissance lente, C.R ; Croissance rapide.
Test catalase et oxydase : (+) catalase/oxydase positive, (-) : Catalase/oxydase négative
0 : Indéterminée.

5. Conservation des souches :

Les souches, Object de notre étude, sont conservées par la méthode de congélation en vue d'une poursuite des travaux dans ce domaine, ainsi que pour une identification des souches plus approfondie et d'une étude éco-toxicologique des Rhizoia.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre étude se veut d'être une contribution à la recherche des caractéristiques des bactéries isolées à partir des nodules racinaires des espèces végétales *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioïdes*, *Vicia sativa* et *Trifolium hybridum*, quatre légumineuses fourragères spontanées appartenant au cortège floristique de la région de Blida dans le nord Algérien.

A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées ont le même aspect morphologique que les souches appartenant au genre *Rhizobium*. En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des souches étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs **Vincent 1970, Somasegaran et Hoben 1994, Jordan 1984**.

L'aspect morphologique des isolats sur les différents milieux de culture montre que les bactéries de l'espèce *L. ornithopodioïdes* ont une croissance rapide par rapport aux autres isolats, avec un aspect visqueux.

La croissance sur YMA-rouge Congo, de l'ensemble des isolats, montre que ceux-ci présentent une différence dans l'absorption du rouge Congo et ne modifient pas le pH du milieu GPA sauf les isolats de l'espèce *L. edulis*.

Les résultats de la coloration de Gram a permis d'observer des coccobacilles à Gram positive de tailles différentes (espèce *L. edulis*), des court bâtonnets (espèce *L. ornithopodioïdes*) et des bâtonnets (espèce *V. sativa*) à Gram négative et compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia.

L'examen de mobilité montre que les isolats sont mobiles (virage de couleur du rouge au jaune orangé).

Les résultats sur le milieu YMA-BTB ont révélé une acidification pour les bactéries appartenant aux *L. ornithopodioïdes* en 72 heures ce qui peut nous orienter vers le genre *Rhizobium*. Le reste des isolats a donné une alcalinisation de milieu donc ce sont des bactéries à croissance lente (*Bradirhizobium*).

La recherche des enzymes respiratoires nous a permis d'observer trois catalases positives pour les isolats qui appartiennent aux espèces *L. ornithopodioïdes*, *V. sativa* et *T. hybridum*, et une catalase négative pour l'isolat de l'espèce *L. edulis*, et des oxydases positives pour tous les isolats.

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan applications et pourraient également servir de base pour des travaux ultérieurs, dont on peut noter :

- Une étude plus approfondie de la tolérance des souches aux différents stress environnementaux et de leur potentiel fixateur d'azote.
- L'utilisation de ces souches dans des essais d'inoculation sous serre puis au champ.
- Etude de la résistance des souches aux métaux lourds.
- L'étude de l'aptitude des souches à noduler d'autres légumineuses.
- La performance de ces bactéries à promouvoir la croissance des espèces céréalières et légumières et à aider au contournement du stress abiotique (salinité, sécheresse, métaux lourds).

References bibliographiques

Références bibliographiques

1. **ABDESSEL, A, LATACHE N. (2017).** IDENTIFICATIONS ET CARACTÉRISATIONS DES BACTÉRIES ISOLEES A PARTIR DE DIFFERENTS SOLS. MEMOIRE MASTER : OPTION MICROBIOLOGIE. UNIVERSITE DE TLEMCCEN. 63 P.
2. **Ahmad, E., Zaidi, A., Khan M.S., Oves, M. (2012)** Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen fixing microorganisms and host legumes. *Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation. Springer, Vienna*, pp 29–44.
3. **Alexander, D. B., Zuberer, D. A. (1991)** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39–45.
4. **Alexander P. (2017),** *Rhizobium Biology and Biotechnology* , University Uttar Pradesh, Noida, UP, India, Alexander P. Hansen Devendra K. Choudhary Pawan Kumar Agrawal Ajit Varma, 348 p.
5. **Bano, A. and Iqbal, S. (2010).** Variation in Rhizobium and Azospirillum strains isolated from maize growing in arid and semiarid areas. *Int. J. Agri. Biol.* 10: 612-618.
6. **Basu, A.; Prasad, P.; Das, S.N.; Kalam, S.; Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; El Enshasy, H. (2021).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, *Constraints, and Prospects. Sustainability*, 13, 1140.
7. **Benharkat M, ; Feredj N. (2018).** Isolement et caractérisations des bactéries nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L). master en biologie appliqué. Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, 80 p.
8. **Bohlool, B. B., Ladha, J. K., Garrity, D. P., George, T. (1992).** Biological Nitrogen fixation for Sustainable Agriculture: *A perspective (Historical archive). Plant Soil* 141:1-11.
9. **Bouchentouf, L., Laabas, S., Boukhatem, Z., Ighil, H., Bekki, A. (2015).** Study of culture of six symbiotic cultivars bean and survey of their nodulation under field natural conditions in West Algeria. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences.* Vol., 8 (4), 631-637.
10. **Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010)** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, *colonization mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol Biochem* 42:669–678. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024.
11. **Dahbia, C. (2016).** Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d'azote. Thèse de doctorat en MICROBIOLOGIE APPLIQUEE. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA. 138 P.

12. **Dary, M., Chamber-Pérez, M. A., Palomares, A. J., Pajuelo, E. (2010)** “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater* 177(1):323–330.
13. **Drew EA, Charman N, Dingemans R et al (2011)** Symbiotic performance of Mediterranean *Trifolium* spp. with naturalised soil rhizobia. *Crop Pasture Sci* 62(10):903.
14. **Eloísa P, Patricia P, Asunción R, Julián D, Bouchra D. (2016).** Improving Legume–Rhizobium Symbiosis for Copper Phytostabilization Through Genetic Manipulation of Both Symbionts. In: Fernando Gonzalez-Andrée. *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial plant-microbe interactions*. University of Leon (Spain): Euan James. 181-191 p. pringer International Publishing Switzerland 978-3-319-32528-6.
15. **Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP et al. (2013)** Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr Soil Sci* 176 (6):876–882.
16. **Frédéric Z. (2004).** DIVERSITE DES BACTERIES HÔTES DE LEGUMINEUSES MEDITERRANEENNES EN TUNISIE ET AU LIBAN. THESE DE DOCTORAT : BIOLOGIE DE EVOLUTION ET ECOLOGIE. 211 P.
17. **García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R. (2015).** Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng* 2(3):183–205. doi:10.3934/bioeng.2015.3.183.
18. **Gramma, B. S. (2008).** Utilisation des techniques d’électrophorèse pour l’identification et l’étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Mémoire de Magistère En GENETIQUE ET AMELIORATION DES PLANTES. Université Mentouri Constantine.120 P.
19. **Gutiérrez-Zamora, M., Martínez-Romero E. (2001).** Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* 91:117–126.
20. **HANSALI K: BANOUH S. (2020).** Les Bactéries solubilisatrices du phosphate : Avancées et perspectives en agriculture modern. Mémoire master : Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA. 61P.
21. **HELEN, E. A. (2015),** NODULATION AND NITROGEN FIXATION OF INDIGENOUS RHIZOBIA IN SOILS CULTIVATED AND UNCULTIVATED WITH AFRICAN YAM BEAN (*SPHENOSTYLIS STENOCARPA*), MASTER OF PHILOSOPHY DEGREE IN SOIL SCIENCE. University of Ghana, 170 p.
22. **Kamboj D, Kumar R, Kumari A et al. (2008).** Rhizobia, nod factors and nodulation—a review. *Agric Rev* 29(3):200–206.

- 23. Karivaradharajan S,; Vandana Y,; Deepti T,; Dolly W,; Annapurna K and Shiv K. (2020),** Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production, *Plants* 2020, 9, 1596.
- 24. Marek-Kozaczuk M, Leszcz A, Wielbo J et al. (2013).** Rhizobium pisi sv. trifolii K3.22 harboring nod genes of the Rhizobium leguminosarum sv. trifolii cluster. *Syst Appl Microbiol* 36:252–258.
- 25. Marta, M. G., Esther, M. (2017).** Pedro F. Mateos¹, Álvaro Peix² Encarna Velazquez, Raúl Rivas. Mesorhizobium helmanticense sp. nov., isolated from Lotus corniculatus nodules. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. Vol 67. :2301–2305.
- 26. Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J. (1994).** The effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. *Appl Environ Microbiol* 60: 1206-1212.
- 27. Nicaise T ;, Odi Faustin A ;, Sévérin A (2020).** Effets de six légumineuses spontanées les plus répandues dans les jachères naturelles sur la fertilité des sols dans la région de Daloa (Côte d’Ivoire). *Internationale journal of biological and chemical science*. 14(3): 1052-1064,
- 28. P. N. Bhattacharyya ;, D. K. Jha. (2011).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1327–1350.
- 29. Pajuelo E, Rodríguez-Llrente ID, Lafuente A, Caviedes MA (2011)** Legume-rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. In: Khan MS, Zaidi A, Goel R, Musarrat J (eds) *Biomanagement of metal contaminated soils, environmental pollution*, vol 20. Springer, Germany, pp 95–123.
- 30. Quèzel P, Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. Editer par Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France, p: 498, 501.
- 31. Rogers M E, Colmer T D, Frost K, Henry D, Cornwall D, Hulm E, Deretic J, Hughes S R, Craig A D. (2008).** Diversity in the genus Melilotus for tolerance to salinity and waterlogging. *Plant Soil* 304: 89-90.
- 32. Saharan B S, Nehra V. (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 11 : 1-4.
- 33. Sakina, B. (2017).** Le genre Vicia L. en Algérie Caractérisation de 11 taxa naturels : Approches éco-géographique, morphologique, biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat en biotechnologie végétale. Université Frères MENTOURI Constantine. 120 p.

34. **SAOUDI, M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister : Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine. 99 P.
35. **SELAMI, N. (2015).** Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma* : Approches Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale, Caractérisation Moléculaire des Isolats. Thèse de doctorat en Biotechnologie Végétale. Université d'Oran Mohamed Boudiaf. 150 P.
36. **Sondous, K. (2019).** Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus* de la région de Biskra. MÉMOIRE DE MASTER en Microbiologie appliqué. Université Mohamed Khider de Biskra 68 P.
37. **Takuji O. (2014).** *In biology and ecology of nitrogen fixation*, Tokyo (japon). 273 p. Advance in Biology and Ecology. 978-9535112167.
38. **Wielvo J, Podlesna A, Kidal D et al (2015)** The diversity of pea microsymbionts in various types of soils and their effects on plant host productivity. *Microbes Environ* 30(3):254–261. doi:10. 1264/jsme2.ME14141.
39. **Zhang YJ, Zheng WT, Everall I et al (2015).** *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2960–2967.
40. **Site web1:** https://www.florealpes.com/fiche_lotusedulis.php.
41. **Site web 2:** https://fr.wikipedia.org/wiki/Universit%C3%A9_Blida_1#/map/0.
42. **Site web 3:** <https://www.preservons-la-nature.fr/flore/taxon/2858.html>.
43. **Site web 4:** www.aujardin.info.

Annexes

Annexe 1 :

Milieux de culture et solutions utilisés:

1. Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

2. Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB	1000ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

3. Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

4. Composition de milieu YMA + Bleu de Bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

5. Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + Pourpre de Bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

6. Les solutions stocks colorants

- Solution stock de RC : 0.25g de Rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.
- Solution stock de BCP : 1g de BCP dissous dans 100ml d'éthanol.
- Solution stock de BTB : 0.5g de BTB dissous dans 100ml d'éthanol.

7. Composition du milieu Mannitol mobilité (g/l).

Peptone	15 g
Mannitol	10 g
Extrait de viande	3 g
Rouge de phénol	0,05 g
Nitrate de potassium	1 g
Agar	4 g
PH	7,8
Eau distillée	1000 ml

Autoclavage 120 C pendant 20 minutes.