

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
خميس مليانة جامعة جيلالي بونعامة
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la terre
Département de Biologie



MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER
EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie Appliquée

Thème :

**Isolement et caractérisations des bactéries
nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L)**

Présenté Par:

M^{lle}. Benharkat Maroua.

M^{lle}. Feredj Nacera.

Devant le Jury :

Soutenu le: 16-07-2018

<u>Président:</u>	M ^{me} Guitarni. H	MCB	U. Khemis Miliana
<u>Promotrice:</u>	M ^{me} Brahimi. S	MAA	U. Khemis Miliana
<u>Examinatrice :</u>	M ^{me} Benshila.S	MAB	U. Khemis Miliana

Année universitaire: 2017/2018.

Remerciements

Nous remercions avant tous Allah de nous avoir donné la volonté et la santé et la patience pour faire ce travail.

Nous remercions particulièrement Mme GUITARNI Hasina chef de département de microbiologie pour ses conseils et ses orientations ainsi que pour ses encouragements et son aide pour l'honneur qu'il fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Nos vifs remerciements sont adressés au membre de jury :

Mme BENSOUHILA .pour l'honneur qu'elle nous ont fait en accepte de juger notre travail.

Et une grand merci à notre Promotrice Mme BRAHIMI Samira pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de nous encadrer, pour son accueil au sein de son laboratoire ainsi que pour ses recommandations et ses conseils qui ont beaucoup enrichi notre recherche.

Nous aimerons remercier aussi tout le personnel du Laboratoire de microbiologie de nous avoir aidés à chaque fois qu'on en avait besoin. Un grand merci à tous nos enseignants, qui ont contribué à notre formation durant toutes nos études à l'Université de Djilali Bounaàma Nous n'oublions pas de remercier toute personne ayant participé et aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Maroua et Nacera

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde, qui sont la lumière
de*

*Mes yeux et les deux bougies de ma vie et qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite
dans mes études.*

*À mon très cher père qui a toujours été là pour moi, à aider et conseiller pour choisir
toujours le bon chemin à suivre.*

*À ma noble mère, cette grande et douce amie qui a toujours su garder le sourire et me
réconforter même dans les moments les plus difficiles.*

*Que Dieu les garde pour moi en bonne santé et leurs donne une longue vie pour qu'ils
assistent à tous mes succès.*

*A mon très cher fiancée kada, ma vie à mes côtés est remplie de belle surprise. Tes sacrifices,
ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis
de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait
vu le jour.*

À mes très chers sœurs: Kheira; Safaa

À mes très chers frères : Yakoube et Ishaq" ;

A mes très chères amies Fatiha, Khadidja

A toute la famille Benharkat et Bekaddour qui m'ont encouragé.

*À Nacera, ma très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension et sa
bonne humeur.*

À toute la promotion de Microbiologie 2017/2018.

Maroua

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chères parents, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études.

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:

Mes très chères sœurs : Hayet, Zahia, Hizia, Fatma.

Mes frères : Miloud, Hocine, Mohammed et, Bendoba.

Sans oublier les petits enfants : Abderrahmane, Anes et Ghofran

Mes adorables amis : Fatiha, Khadija, Fatima, Amina, Siham, Noura, et Bouchra et toutes mes amies.

*A mon bras droit, ma moitié et mon binôme Maroua qui m'a apporté :
Force, amitié, patience*

À tous ceux qui ont une place dans mon cœur.

À toute la promotion de Microbiologie 2017/2018.

Nacera

Résumé

Résumé :

Ce travail a été réalisé pour isoler les bactéries nodulantes de légumineuse à partir des nodules racinaires de la légumineuse la luzerne (*Medicago Sativa* L.) répandues dans la région de Ain Lechiakh et Attaf de Ain Defla.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'avoir des colonies homogènes d'une forme circulaire, un contour régulier et une surface semi bombée, des bacilles à Gram négatif, suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclut des tests biochimiques et des tests physiologiques, ces tests sont complétés par l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques. L'étude de leur potentiel symbiotique a été réalisée afin de déterminer leur capacité à former des nodules sur la plante hôte.

Cette étude a montré que les souches étudiées ont une bonne croissance à 28°C, entre pH 6 et 7, cependant le NaCl affecte négativement la croissance lorsque sa concentration dépasse 600 mM. Ces souches présentent des caractères biochimiques différents et la plupart sont sensibles aux antibiotiques utilisés, cinq souches ont la capacité de noduler notre plante.

Mot clés : La luzerne (*Medicago Sativa* L.), la caractérisation phénotypique, Nodulation.

Résumé

Abstract

This work was carried out on bacteria nodulate the legume isolated from root nodules of the legume Luzerne (*Medicago Sativa* L.) Widespread in the area of Ain Lechiakh etAttaf wilaya of Ain Defla to assess and characterize the existing phenotypic diversity and characterize the diversity phenotypic existing between the 08 isolates .

Strain characterization relates to a morphological study, followed by a phenotypic characterization tests which include biochemical and physiological tests. And nutritional tests this experiment was completed with study of the antibiotics resistance and also to confirm their capacity symbiotic using to format the nodules.

This study showed that the strains have a good growth in the temperature 28°C, and between pH 6 and 7, but concentrations up to 600 mM de NaCl has a negative effect on the rhizobia growth. These strains present a different biochemical characters and the majority of the strains was sensitive to the antibiotics used in this study, this rhizobia showed also a capacity to modulate our plant

Key words: la luzerne (*Medicago Sativa* L.), phenotypic characterization, Nodulation

Résumé

:		
اجريت هذه	من اجل عزل بكتيريا العقد البقولية	الجزرية للبقوليات ()
منطقه عين	شاياخ	ولاية عين .
التوصيف المظهري	بتكوين	محيط
عصيات	يليهها توصيف ظاهري يشمل	كيميوحيوية
غذائية	هذه	الحيوية
لهذه	على العشب المضيقة .	الميزة التعايشية
هذه	بينت	بين 6 7
الكيميائية	فهي	خصائصها
اغلبها	الحيوية	تكوين الجزرية
المفتاحية:	المظهري	(<i>Medicago Sativa L</i>) التعقيدات

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH :	Arginine Di Hydrolase.
AMY :	Amygdaline
API 20:^E	Appareil pour Identification de 20 Entérobactéries
ARA:	Arabinose.
BNL :	Bactéries Nodulant les légumineuses
BTB :	bleu de bromothymol
C :	Celsius
CIT:	trisodium Citrate.
CO2:	Dioxyde de carbone.
Cm :	Centimètre
Fe :	fer
GEL:	Gélatine.
GLU:	Glucose.
H2:	Di Hydrogène.
H2S:	Di hydrosulfure
IND:	Indol
INO:	inositol
LCO:	lipochitino-oligosaccharides
LDC:	Lysine Decarboxylase
LPS :	lipopolysaccharides
MEL:	Mélobiose.
MAN:	Mannitol.
mM :	milli mole
mm:	millimètre.
N2:	Diazote.
NaCl:	Chlorure de sodium
NH4+:	ions d'ammonium.
Nod:	Gène de nodulation.
NO3/N2:	Nitrate/Nitrite réductase.
ODC :	Ornithine Décarboxylase
OX:	Oxydase.

PH:	potentiel Hydrogéné.
PNPG:	l'enzyme -galactosidase
RHA:	Rhamnose
S2O3:	Thiosulfate
SOR:	sorbitol
SUC:	sucrose
URE:	Urease
VP:	Voges Priskauer.
µm :	Micrometer

LISTE DES FIGURES

	PAGE
Figure 01 Cycle de l'azote (<i>Tortora et al., 2003</i>)	03
Figure 02 Classification phylogénique des Légumineuses (Doyle et al. 1998)	05
Figure 03 Morphologie de la luzerne <i>Medicagosativa</i> L. (<i>CHIDERS, 2008</i>)	08
Figure 04 Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse	13
Figure 05 Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante (Perry et al., 2004).	16
Figure 06 Cart géographique de l'Algérie représentant la localisation des sites d'échantillonnages	17
Figure 07 Les étapes de collecte de nodules	18
Figure 08 Technique d'Isolément des Bactérie nodulante la luzerne	18
Figure 09 Technique de purification	19
Figure 10 Préparation des tubes de cultures	26
Figure 11 I 'inoculation des plantules	27
Figure 12 Aspects des nodules observés sur les racines de <i>Medicago sativa</i> L.	28
Figure 13 Aspect macroscopique de quelques colonies de rhizobia après 3 jours de culture sur YEM à 28°C (résultats de première purification).	29
Figure 14 Les résultats d'isolement et purification d'isolats.	29
Figure 15 RH8, RH4.	30
Figure 16 Aspect microscopique des isolats RH 1 et RH2 Observation (G×100) au microscope optique.	31
Figure 17 Aspect macroscopique de la croissance de quelques souches sur milieu de culture YEM + bleu de bromothymol à 28 ° C pendant 72 heures.	32
Figure 18 Résultats de Test de catalase et oxydase.	32
Figure 19 Exemples des résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries (photo originale).	35
Figure 20 Aspect macroscopique des quelques souches a différents pH (photo originale)	36

Figure 21	Aspect macroscopique des souches a différents températures.	37
Figure 22	Evaluation de la croissance des souches isolées de <i>Medicago sativa</i> L à différents températures.	38
Figure 23	Aspect macroscopique des souches a déférent concentration de NaCl.	39
Figure 24	Seuil de la tolérance des souches isolées de <i>Medicago sativa Lau</i> stress salin.	40
Figure 25	L'effet des antibiotiques sur le comportement des souches isolées de <i>Medicago sativa L.</i>	41
Figure 26	Histogramme de résistances et les sensibilités aux antibiotiques	42
Figure 27	Aspect des graines de <i>MedicagosativaL</i> .germées après 72h de croissance à température ombient.	43
Figure 28	L'effectivité d'inoculation de plantules.	44
Figure 29	Effectivité des souches isolées de <i>Medicago sativa L.</i> (Plantes inocules).	45
Figure 30	Aspect des nodules obtenus lors du test de nodulation.	46

LISTE DES TABLEAUX

		PAGE
Tableau 01	Les antibiotiques utilisés avec charges des disques.	24
Tableau 02	Résultats de la caractérisation biochimique	33
Tableau 03	Résultats du test de sensibilité et de tolérance des souches aux antibiotiques	40

SOMMIARE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction 01

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUE

1-La fixation biologique de l'azote atmosphérique 03

2- Symbiose rhizobium-légumineuse(BNL) 04

2-1 -Les légumineuses 04

a -Systématique..... 04

b- Situation des légumineuses en Algérie 05

2 -2-La luzerne (*Medicago sativa L.*) 06

a-Origines et caractéristiques de la plantes..... 06

b-Taxonomie de la luzerne 06

c-Morphologie de la luzerne. 07

d-L'aire de répartition du genre *Medicago sativa L.* 08

e-Intérêt de la luzerne..... 09

2-3-Rhizobium..... 10

2-3-1-Généralité..... 10

2-3-2-Caractères des rhizobia..... 10

a -Caractères morphologiques et culturaux..... 10

b -Caractères biochimique..... 11

c -Caractères physiologiques 11

d- Caractères symbiotiques..... 11

2-3-3-Classification des rhizobia..... 12

3- Etablissement de la symbioseRhizobium-légumineuse 12

4 -La nodulation..... 14

4-1- Mécanisme de la nodulation..... 14

4 -2-Processus de nodulation 14

4-2-1-Pré-échange de signal d'infection 14

4-2-2-Infection	14
4-2-3-Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	15

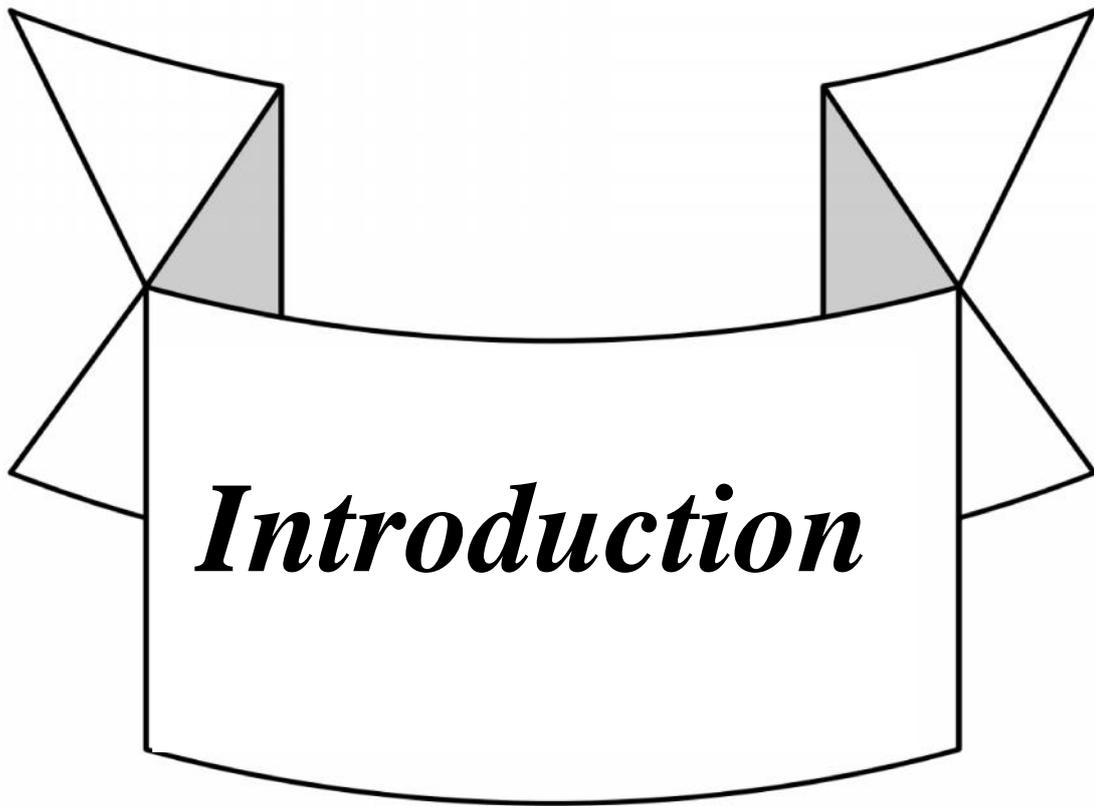
MATERIELS ET METHODES

1- Echantillonnage des nodules	17
2-Isolement des bactéries nodulant la luzerne (<i>Médicago sativa</i> L)	17
2-1- Collecte des nodules.....	17
2-2 -Technique d'isolement des BNL.....	18
2-3- Purification des isolats.....	18
3-Conservation des isolats.....	19
4-Caractérisation morphologiques des isolats	19
4-1-Etude macroscopique	19
4-2-Etude microscopique	19
5- Test de bleu de bromothymol (BTB)	20
6-Caractérisation biochimiques.....	20
6-1- Test de la catalase.....	20
6-2- Test de l'oxydase.....	20
6-3-Galerie API 20 ^E	20
6-3-1-Préparation et inoculation de la galerie.....	21
6-3-2-Lecture de la galerie.....	22
7-Caractérisation physiologique.....	23
7-1-L'effet de pH.....	23
7-2-L'effet de température.....	23
7-3-L'effet du NaCl.....	23
8-Etude de la sensibilité et de la tolérance des isolats aux antibiotiques.....	23
9-Authentification des isolats.....	25
9-1-Germination des graines	25
9-2-Culture des plantules	25
9-2-1-préparation des tubes de cultures.....	25
9-2-2-Mise en culture des plantules.....	26
9-2-3-Inoculation des plantules.....	26

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1-Phénologie de la nodulation de <i>Médicago sativa</i> L	28
2-L'isolement bactérien à partir des nodules	28

3-Characterisation morphologiques.....	29
3-1-Etudes macroscopique.....	29
3-2-Etude microscopique.....	31
4- Test de bleu de bromothymol (BTB)	31
5-Characterisation biochimiques.....	32
5-1-Test de catalase et oxydase	32
5-2-Galerie API 20 ^E	33
5-2-1-Résultats des tests conventionnels	33
5-2-2 .Résultats des tests de métabolisme des glucides	34
6-Characterisation physiologique.....	36
6- 1-L'effet de pH.....	36
6-2- L'effet de température.....	37
6-3- Tolérance au NaCl.....	39
7-Etude de la sensibilité et de la tolérance des souches aux antibiotiques.....	40
8-Authentification des isolats.....	42
8-1-Propriétés germinatives des graines de <i>Médicago sativa</i> L.....	42
8-2-Test de nodulation	43
Conclusion	47
Références bibliographiques	
Annexes	



Introduction

L'azote est l'élément chimique le plus abondant dans l'atmosphère terrestre, il s'y trouve sous sa forme moléculaire normale diatomique N_2 non assimilable par les plantes (**Duc et al., 2010**). L'acquisition d'azote métaboliquement utilisable est essentielle pour la croissance et la survie de tout organisme. Dans les systèmes de production agricole, après l'eau, l'azote est l'élément nutritif qui limite le développement des végétaux (**Burns et Hardy, 1975**).

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes, elles jouent un rôle très important dans la restauration des sols pauvres et dégradés de plus elles sont connues pour leur capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec des micro-organismes telluriques appelés les rhizobia. Cette symbiose se manifeste par la formation sur les racines des légumineuses hôtes des organes spécialisés "nodosités" qui sont le site de fixation d'azote. La symbiose rhizobia légumineuses présente beaucoup d'intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés. Cette association symbiotique est considérée par conséquent comme un moyen intéressant pour l'utilisation dans les projets environnementaux, de ce fait la connaissance des deux partenaires symbiotiques s'avère de première nécessité.

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est l'une des plantes fourragères les plus répandues sur tous les continents. Sa culture remonterait à plus de 9000 ans, sur les hauts plateaux du Caucase, en Iran et en Turquie d'où elle se serait répandue dans le monde entier. Où elle était appelée Alfalfa « le meilleur des fourrages ». A l'heure actuelle, la luzerne est la plante fourragère la plus cultivée dans le monde en raison de ses propriétés nutritives et médicinales (**Brooker, 2007**). Elle est notamment très répandue dans les zones tempérées chaudes subtropicales et en altitude (**Mauries, 2003**). Selon **Toutain (1979)**, la luzerne est une plante qui s'adapte au climat saharien et elle est très productive puisqu'elle peut produire dans de bonne condition, jusqu'à 100 t de matière verte par ha et de 2.5 kg de foin de la luzerne.

Le but de notre travail; dans ce contexte; est d'évaluer la diversité des bactéries associées au *Medicago sativa* dans la région d'Ain el Defla.

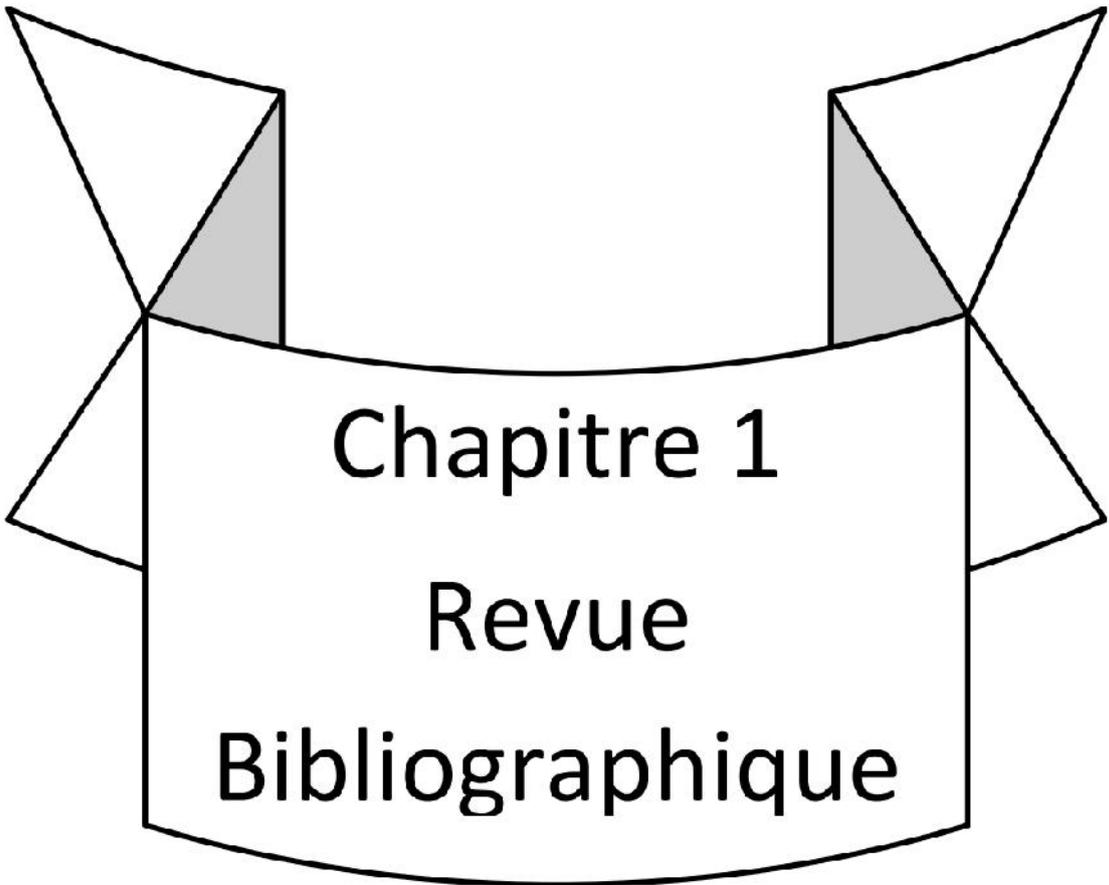
Notre travail est basé sur trois objectifs principaux :

Le premier ayant pour but d'isoler les souches de *Rhizobium* à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Medicago sativa*, dans cette phase nous avons procédé à un isolement et une caractérisation phénotypique selon les techniques usuelles propres aux rhizobia.

Le second objectif, présente une étude de l'effet des facteurs abiotique (pH, Température et le stress salin selon différentes concentration de NaCl).

Le troisième objectif, c'est d'étudier la capacité des isolats à former des nodosités fixatrices d'azote sur la plante hôte (test de nodulation).

Ce mémoire est constitué de trois parties : une étude bibliographique qui présente des généralités sur les deux partenaires (légumineuses et rhizobia) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuse), chapitre matériel et méthodes ainsi qu'un chapitre rassemblant la discussion de tous les résultats obtenus.



Chapitre 1

Revue

Bibliographique

1-La fixation biologique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains micro-organismes transforment l'azote de l'air (N_2 ou diazote) en ammoniac (*Huheevet et al., 1996; Chambenoit, 2002; Hopkins, 2003; Wekeford, 2004, Ricklefs et Miller, 2005; Rose et Mueller, 2006*). Elle résulte de l'activité d'une enzyme qui s'appelle la nitrogénase (*Davet, 1996; Lengenter et al., 1999; Prescott et al., 2003; Maier et al., 2009*) (Figure 01).

Les micro-organismes fixateurs d'azote dit diazotrophes remplissent une fonction écologique irremplaçable (*Davet, 1996*). Ce sont des procaryotes (bactéries et cyanobactéries), qui vivent soit à l'état libre dans le sol (*Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Rhodospirillum (Davet, 1996; Madigan et Martinko; 2007)*). éventuellement en association avec un végétal (*Azospirillum (Luttge et al., 1994, Perry et al., 2004, Pelmont, 2005)*), soit en symbiose avec un végétal (Les Rhizobia, Les Frankia, Anabaena (*Luttge et al., 1994, Vilain, 1997*)).

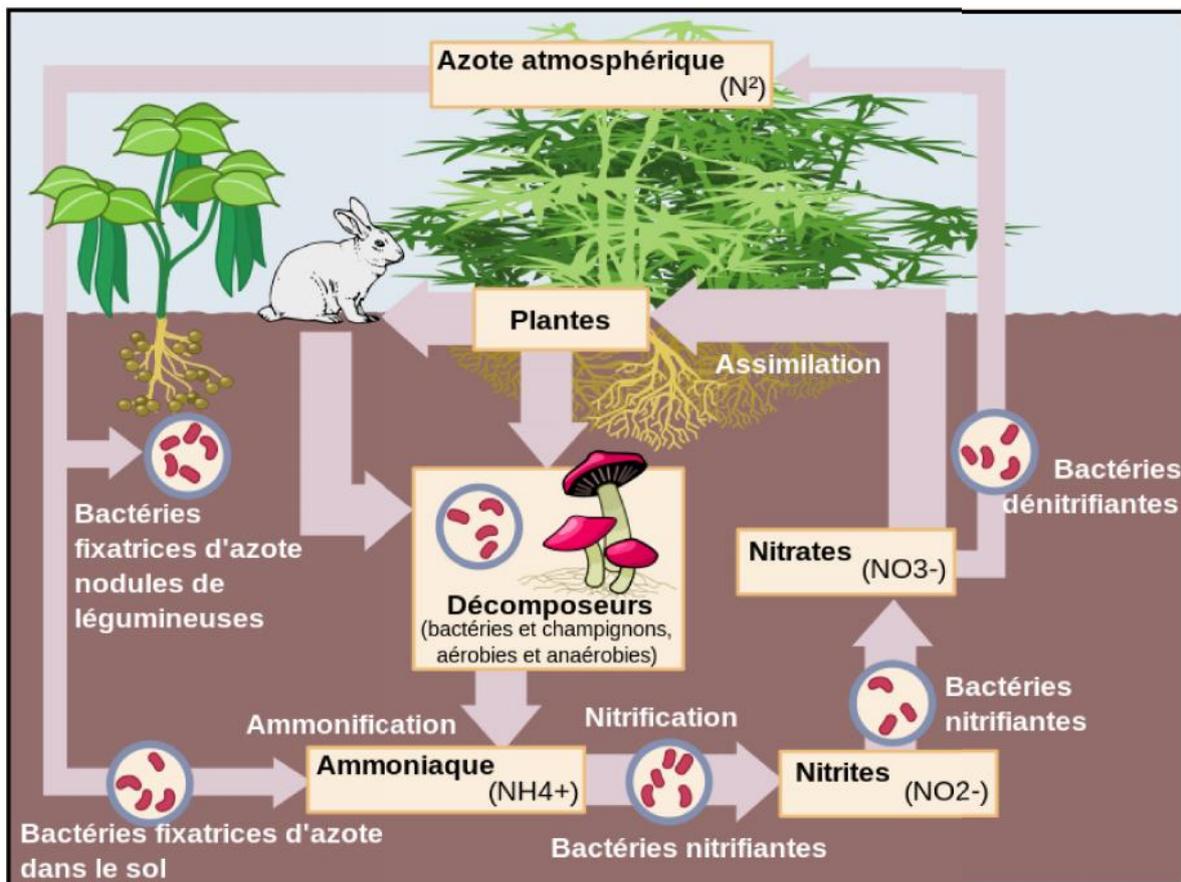


Figure 01 : Cycle de l'azote (*Pyjic; 2009*)

2- Symbiose rhizobium-légumineuse(BNL)

2-1 -Les légumineuses

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 650 genres et 18000 espèces. Cette famille comprend des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses ; elle colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre. Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo).

a -Systématique

En classification classique(Figure 02), en se basant sur la forme florale (différences florales), ce groupe de plantes correspond à la famille des *Leguminosae* avec trois sous-familles : *Mimosoideae*, *Papillionoideae* (monophylétiques) et *Caesalpinioideae*(paraphylétique) (*Taubert, 1894 ; Guignard et Dupont, 2005*).

La classification taxonomique postérieure a mis dans l'ordre des fabales ces sous-familles des légumineuses qui sont, les *Mimosaceae*, les *Caesalpinaceae* et les *Fabaceae*. Actuellement on accepte la classification des légumineuses dans la famille des *Fabaceae* qui comprend 20000 espèces distribuées en trois sous-familles, *Faboideae*, *Mimosoideae* et *Caesalpinioideae*. Les *Faboideae* et les *Mimosoideae* constituent le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (*Raven et al., 2000*)

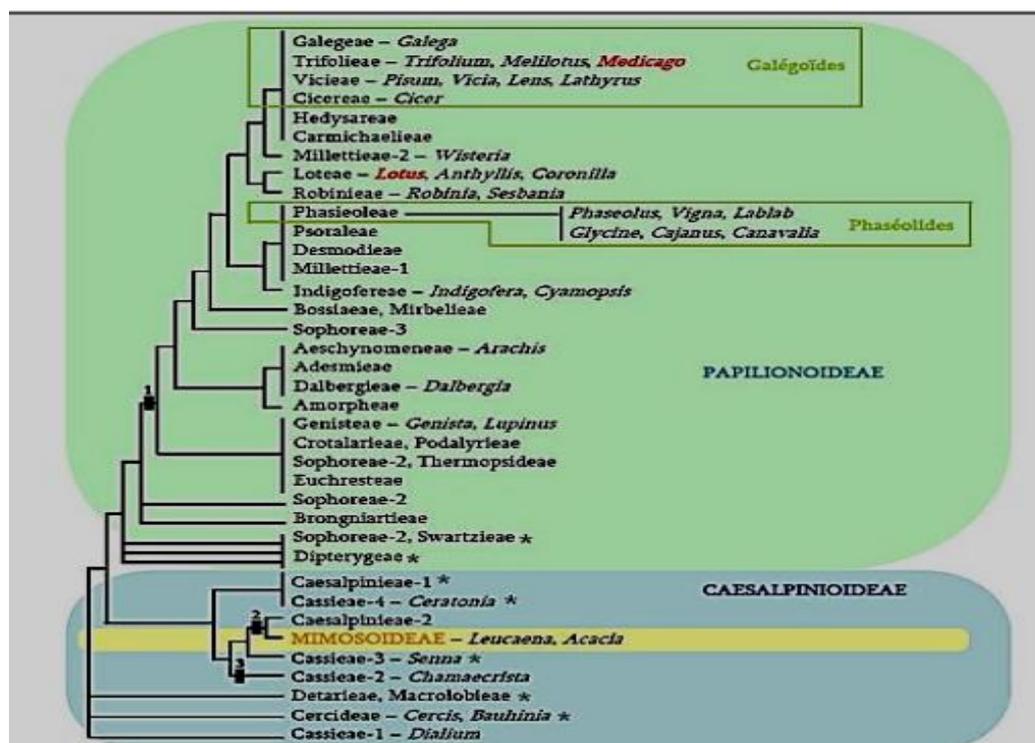


Figure 02 : Classification phylogénique des Légumineuses (Doyle et al. 1998)

b- Situation des légumineuses en Algérie

Quoique sur les 237.806.000 hectares, seulement 3,3% sont à vocation agricole, l'Algérie demeure pas moins un pays de contrastes, se distinguant par une variation éco-géographique très remarquée. Le désert occupe les 4/5 du pays et le 1/5 restant est largement occupé par les étages bioclimatiques arides et semi-aride. Les étages subhumide et humide couvrent des surfaces relativement plus restreintes. Cette variation des milieux s'accompagne d'une importante diversité de la faune et de la flore.

Selon le **Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (1992)**, l'Algérie renferme 3300 espèces vasculaires spontanées dont 168 sont endémiques. Elle se classe en deuxième position après le Maroc et elle est suivie par la Tunisie. A eux trois, ces pays se partagent un héritage de plus 6151 espèces vasculaires spontanées dont 710 sont endémiques au Maghreb.

Dans la flore algérienne, les Fabaceae sont représentées par environ 360 espèces et sous-espèces, dont 41 % rares à très rares et 13 % endémiques au sens large (**Quézel et Santa 1962**). La luzerne et le trèfle, sont peu représentatifs avec 1 à 5% de la superficie cultivée.

Sous l'appellation luzerne cultivée, on classe deux espèces botaniques et leurs hybrides, *Medicago sativa* L., *Medicago falcata* et *Medicago media* (ou *Medicago varia* Mortyn) hybride entre les deux espèces précédentes (**La pevronie, 1982; Mauries, 2003.**).

2 -2-La luzerne (*Medicago sativa* L.)

a-Origines et caractéristiques de la plantes

Selon **LESINS et LESINS, 1979** et **MESSIOUGHI, 2016** la luzerne (*Medicago sativa* L.) appartenant à la famille des Fabacées, est une plante pérenne largement répandue, Hermaphrodite, à pollinisation autogame/allogame, résistante à la sécheresse et aussi c'est une plante fourragère par excellence. C'est l'une des plantes fourragères les plus répandues sur tous les continents. Sa culture remonterait à plus de 9000 ans, dans les hauts plateaux du Caucase, L'Iran et Turquie d'où elle se serait répandue dans le monde entier (**Mauriès, 2003**). *Medicago sativa* est une plante vivace à systèmes racinaires pivotantes, les racines ont des nodosités, et les bactéries qu'elles contiennent (*Sinorhizobium meliloti*) fixent l'azote de l'atmosphère (**Munro et Small, 1997**). Le développement des tiges suit un ordre précis, on distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaire. Les feuilles sont en général de type trifolié. Les fleurs sont regroupées en inflorescences, la couleur des fleurs chez *Medicago sativa* est le mauve- violet (**Mauriès, 2003**). La fécondation est allogame. Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, en forme spiralée. La graine est plus ou moins réniforme (**Camille, 1980**).

b-Taxonomie de la luzerne

D'après l'Angiosperm Phylogenic Group III (2009) (**Référence électronique 2**), la classification botanique de la luzerne pérenne cultivée est comme suit :

<input type="checkbox"/> Domaine : Eukaryota <input type="checkbox"/> Règne : Plantae (Lignée verte) <input type="checkbox"/> Sous règne : Tracheobionta <input type="checkbox"/> Division : Magnoliophyta <input type="checkbox"/> Embranchement : Spermaphyta; <input type="checkbox"/> Clade : Fabidae ou Eurosidae	<input type="checkbox"/> Ordre : Fabales <input type="checkbox"/> Famille : Fabaceae (Légumineuses) <input type="checkbox"/> Sous famille : Papilionaceae <input type="checkbox"/> Tribu : Trifolieae <input type="checkbox"/> Genre : <i>Medicago</i> <input type="checkbox"/> Espèce : <i>Medicago sativa</i> L.
---	---

c-Morphologie de la luzerne.

C'est une plante herbacée vivace à tige dressée dès la base puis rameuse et anguleuse. Sa hauteur varie de 30 à 90 cm (*MESSIOUGHI, 2016*). (figure 03)

Racine : La racine pivotante, en sol profond et bien drainé, descend habituellement à 2 m de profondeur. On voit nettement la partie supérieure de la racine de la luzerne, son fort pivot et les racines secondaires. Ces racines portent des petites excroissances isolées ou en grappes, ce sont des nodosités ovoïdes ou d'aspect globuleux dont la taille ne dépasse pas 02 à 03 mm (*INRA MAROC, 1965 et GHEDIRI, 2007*).

Collet : structure complexe située près de la surface du sol, conserve son activité méristématique d'une année à l'autre et produit des bourgeons qui donnent naissance à de nouvelles tiges.

Tige : tiges dressées ou ascendantes, très rameuses. Chaque pied compte 5 à 15 tiges et peut atteindre près d'un mètre de hauteur.

Feuille : La première feuille est unifoliée. Les feuilles suivantes alternes, sont composées de trois folioles égales, glabres, obtuses, un peu échancrées et denticulées (*MESSIOUGHI, 2016*).

Fleur : Les fleurs violettes ou bleuâtres, sont réunies en grappes allongées avec un fruit sous forme d'une gousse plus ou moins enroulée et spiralée de 1 à 4 spires. La floraison se déroule entre juin et octobre (*MESSIOUGHI, 2016*).

Fruit : Le fruit est une gousse non épineuse, recourbée en spirale à 2 - 3 tours de spires renfermant plusieurs grains réniformes, luisants, nombreux de couleur jaune verdâtre, le poids de 1000 grains est d'environ deux grammes (*FOURY, 1954*).

Graine : la luzerne a des graines de petite taille (environ 500 000 graines/kg). (*SICAFRANCE MAÏS, 1990*).



Figure 03: Morphologie de la Luzerne *Medicago sativa* L. (Chiders, 2008)

1: Fleur, 2: Fleur épanouie, 3: Fleur ouverte, 4 et 5 : Un pétale, 6: Une inflorescence en stade fructification, 7: une gousse, 8: Une graine, 9: Coupe longitudinale d'une graine.

d-L'aire de répartition du genre *Medicago sativa* L.

Pour Lapeyronie (1982), les luzernes s'accommodent des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides. Elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient). Certaines ont été introduites en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord. D'après Derek et Ernest (1997), elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes. Les travaux de Mathieu (2003) et Hireche (2006) affirment qu'au cours du XIX^{ème} siècle, Les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne, elles ont ensuite envahi d'autres parties du monde en particulier les continents américaines et australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (Delalande et al. 2007).

Les luzernes annuelles ont parfois des distributions très limitées. Certaines espèces étant endémiques, alors que d'autres sont colonisatrices. Une étude plus précise de la distribution des espèces a été faite à partir des prospections de matériel spontané entreprise depuis de nombreuses années sur l'ensemble du bassin méditerranéen (*Prosperi et al. 1993*). Les espèces annuelles de *Medicago* se retrouvent dans tous les étages bioclimatiques : de l'humide au saharien. Certains espèces sont à large spectre de répartition, d'autres ont une distribution spatiale plus délimitée. *M. truncatula* et *M. polymorpha*, présentes dans tous les étages bioclimatiques, sont considérées comme des formes ubiquistes, un ensemble d'espèces formé par *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. orbicularis* et *M. murex*, s'étend de l'étage humide au semi-aride. Tandis que *M. laciniata* et *M. minima* sont présentes du semi-aride au saharien.

Les *Medicago* pérennes se rencontrent essentiellement sur les rives nord de la Méditerranée et s'étendent jusqu'en Asie centrale ; quelques formes spontanées sont localisées sur les hauts plateaux des chaînes de l'Atlas Nord-Africain. Dans le complexe d'espèces pérennes, l'infertilité est entretenue naturellement entre les différentes formes spontanées qui le composent. Ainsi, le maintien de types différents (populations naturelles ayant des caractères singuliers) est dû essentiellement à l'isolement géographique.

e-Intérêt de la luzerne

La luzerne est considérée dans tous les pays comme une plante fourragère de première importance et dont la culture est la plus ancienne (*La pevronie, 1982; Brumont, 2008*). La luzerne est destinée à l'alimentation des animaux, ruminants et monogastrique, qui se caractérise par une valeur énergétique moyenne et une teneur en protéines élevée (**Génier et al., 1992**). L'intérêt de la luzerne réside également dans le rôle important qu'elle joue dans l'amélioration de la structure des sols liée à son important système racinaire et qui laisse aussi un tonnage important de matière organique (**Adem, 1974; Pousset, 2002**). La luzerne a la capacité d'assurer sa nutrition azotée grâce à la fixation symbiotique et aussi par la voie de l'absorption de l'azote minérale de sol. Son rôle d'espèce épuratrice de nitrates grâce à ses possibilités de captage d'azote en profondeur est du plus vif intérêt (**Muller, 1990 in Génier et al., 1992**). La composition chimique, la régularité du rendement font de la luzerne une espèce industrialisable (luzerne déshydratée et concentré protéique foliaire destinés à l'alimentation animale; protéine blanche Rubisco, bien- tôt utilisées par les industries pharmaceutique et

(ou agro- alimentaires humaines; source envisageable de fibre celluloses) (**Génier et al., 1992**).

2-3-Rhizobium

2-3-1-Généralité

La biodiversité microbienne forme une ressource naturelle énorme pour l'humanité. Les bactéries de racine (rhizobia) sont en particulier utiles par leurs capacités symbiotiques et à la fixation d'azote dans la symbiose avec leurs plantes- hôte(Les légumineuses) .Le mot (rhizobia) 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.

2-3-2-Caractères des rhizobia

a -Caractères morphologiques et culturaux

Les rhizobiums sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulants(**Jordan, 1984**). Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'Alpha-Proteobacteri. (**Zakhia et de Lajudie., 2001; Laranjo et al., 2002**). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches(**Werner, 1992**)Les espèces de rhizobia en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (**Somasegaran et Hoben, 1994**). En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobium et le *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le Ca²⁺ , Fe²⁺ et Co²⁺ , leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate(**Werner, 1992**)

D'après **Somasegaran et Hoben (1994)**, les rhizobia sont réparties en trois groupes. Le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours avec une vitesse de dédoublement chaque 2-4 heures. Le deuxième comprend les *Mésorhizobium* qui sont des bactéries à croissance moyenne, elles produisent une turbidité dans le milieu liquide en 3-4 jours. Alors que les *Bradyrhizobium* désignent

letroisième groupe de rhizobia à croissance lente qui produit un trouble dans le milieu liquide au bout de 4-5 jours. Le milieu le plus utilisé pour la culture des rhizobia est le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) contenant des sels minéraux, du Mannitol, de l'extrait de levure et de l'agar (*Vincent, 1970*). Les souches peuvent apparaître au bout de 3 à 5 jours, elles ont une forme circulaire, incolore ou de couleur blanches, crème, opaques ou translucides, humides, comme elles peuvent être aussi brillantes. Les colonies jaunes sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (*Somasegaran et Hoben, 1994*).

b -Caractères biochimique

Les caractères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différents enzymes tels que le glutamate déshydrogénase, la nitrate réductase, l'uréase, le glucose 6phosphate déshydrogénase, l'adénylate kinase et l'indole- phénol oxydase, ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés (*El-Hilali, 2006*). Les rhizobia à croissance rapide présentent un spectre d'assimilation très large vis-à-vis des substrats carbonés par rapport aux rhizobia à croissance lente (*Graham, 1963*). Cependant la majorité des souches à croissance lente préfèrent le pentose. Les rhizobia n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante hôte et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour leur développement à l'état libre (*Pelmont, 1995*).

c -Caractères physiologiques

Les caractères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie à différentes température, la tolérance aux variations du pH et à différentes concentrations en sels, mais aussi la résistance aux antibiotiques. La croissance des rhizobia est optimale à une température de 28°C et un pH entre 6 et 7 (*Burton et Elkan, 1985*).

d- Caractères symbiotiques

Les caractères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée. Alors que l'infectivité des rhizobia exprime le pouvoir de la bactérie à noduler la plante hôte. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées. (*El-Hilali, 2006*).

2-3-3-Classification des rhizobia

Actuellement, les rhizobia comportent 13 genres et 117 espèces (*Weir, 2016*). Elles appartiennent à la subdivision alpha des protéobactéries dans les genres de: *Rhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* (*Zakhia et De Lajudie, 2001*). Au cours des dernières années des rhizobia ont été aussi découverts dans les bêta protéobactéries dans les genres *Shinella*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*. Les différentes espèces reconnues des rhizobia sont fondées dans les genres décrits ci- dessous:

Rhizobium(*Frank, 1889*), qui contient 49 espèces. –*Mesorhizobium*(*Jarvis et al., 1997*), qui contient 21 espèces. - *Ensifer* autrefois *Sinorhizobium*(*Young, 2003*), contient 17 espèces. –*Bradyrhizobium*(*Jordan, 1982*), qui contient 9 espèces. - *Burkholderia*, (*Chen et al., 2007*) contient 7 espèces. – *Azorhizobium*(*Dreyfus et al., 1988*), qui contient 2 espèces. - *Microvirga*, (*Arley et al., 2011*), qui contient 3 espèces. -*Phyllobacterium*, (*valverd et al., 2005*), qui contient 3 espèces. - *Ochrobactrum*, (*Zurdo-Piñeiro et al., 2007*), qui contient 2 espèces. -*Methylobactérieum* qui contient 1 espèce. -*Cupriavidus* qui contient 1 espèce. - *Devosia* qui contient 1 espèce. –*Shinella*(*Lin et al., 2008*),qui contient 1 espèce

3- Etablissement de la symbiose Rhizobium-légumineuse

La symbiose Rhizobium-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (*Perret et al., 2000 ; Gibson et al., 2008*). Certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires (*Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Giraud et Fleischman, 2004*). L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires.(Figure 04).

Les légumineuses permettent ainsi une réduction de l'utilisation des engrais chimiques azotés soit en utilisation directe (légumineuses alimentaires par exemple), soit lorsqu'elles sont utilisées en rotation de culture en tant qu'engrais verts. Les légumineuses jouent donc un rôle essentiel dans les écosystèmes naturels, en agriculture et en agroforesterie, en colonisant

des espaces pauvres en azote et en constituant une source majeure de fertilisants naturels et économiques pour les cultures. Cependant, beaucoup de légumineuses sont sensibles à la sécheresse et à l'acidité des sols, ce qui gêne l'expansion de ces cultures dans les régions à faible pluviométrie. Ainsi, l'identification d'espèces hôtes et rhizobiennes tolérantes au sel et/ou à l'acidité des sols sont une priorité dans le domaine de la recherche agricole (*Graham et Vance, 2003*).

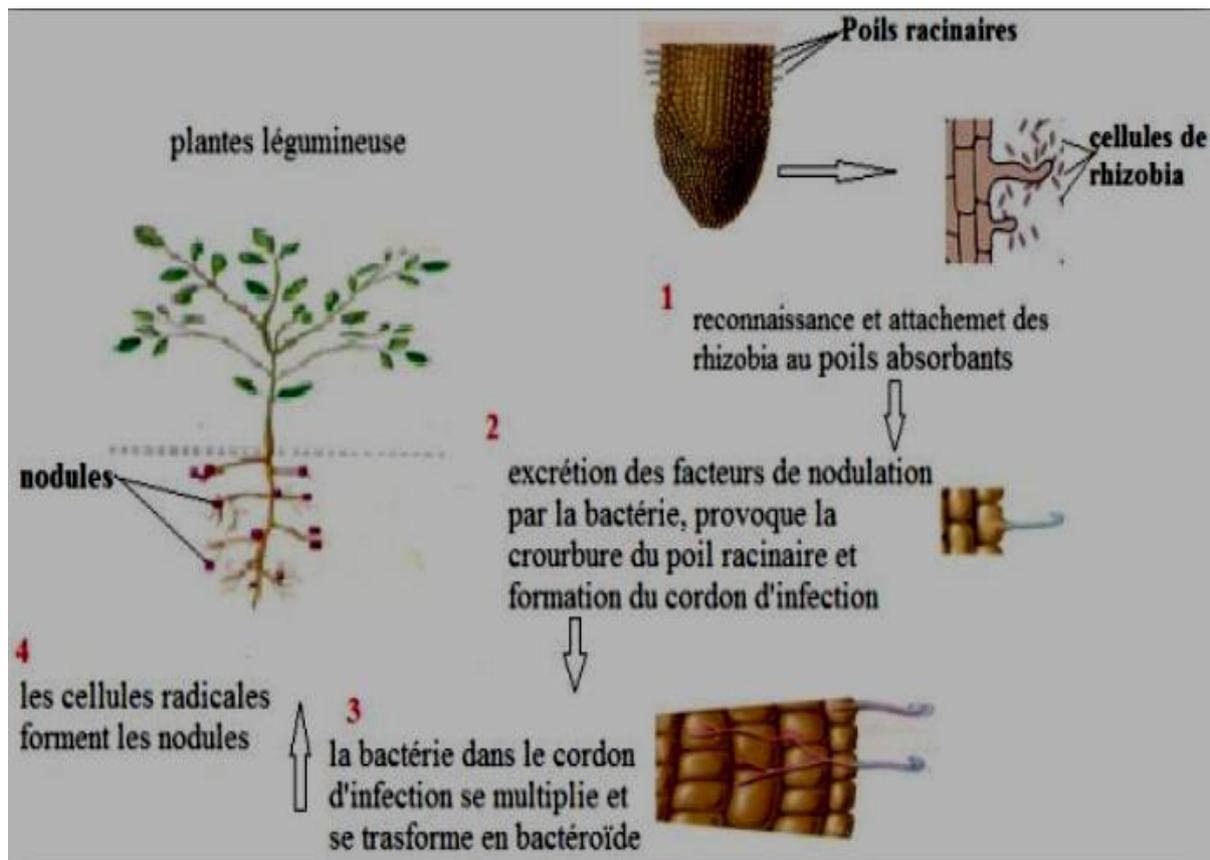


Figure 04: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse.

4 -La nodulation

4-1- Mécanisme de la nodulation

Le processus de nodulation est très complexe, régulé à chaque étape par un échange de signaux nécessaires à l'interaction entre les deux espèces.

4 -2-Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (*Madigan et al., 2007*). La constitution d'un nodule fonctionnel peut être divisée en 3-étapes (Figure 05) :

4-2-1-Pré-échange de signal d'infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions d'ammonium (NH_4^+), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (*Patriarca et al., 2004*). Ce signal, une fois perçu par le Rhizobium, induit l'expression de gènes nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitino-oligosaccharides ou LCO) (*Dénarié, 2000*). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (*Patriarca et al., 2004*). Les rhizobiums diffèrent dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un deuxième niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (*Moschetii et al., 2005*)

4-2-2-Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, « la rhicadhésine ». Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (*Perry et al., 2004*). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (*Dupuy et Nougier, 2005*). Le Rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (*Bélangier, 1998*).

Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (**Machrafi, 2001**). En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, « la polygalacturonase », qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (**Dupuy et Nougier, 2005**). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (**Perry et al., 2004**). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme.

4-2-3-Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe contenant des mucilages limités par des fibrilles cellulosiques d'origine végétale; c'est le filament d'infection (**Dupuy et Nougier, 2005**). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (**Bélanger, 1998**). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes ; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (**Dupuy et Nougier, 2005**).

La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivie de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (**Machrafi, 2001**). La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry et al., 2004). 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 (**Bélanger, 1998**).

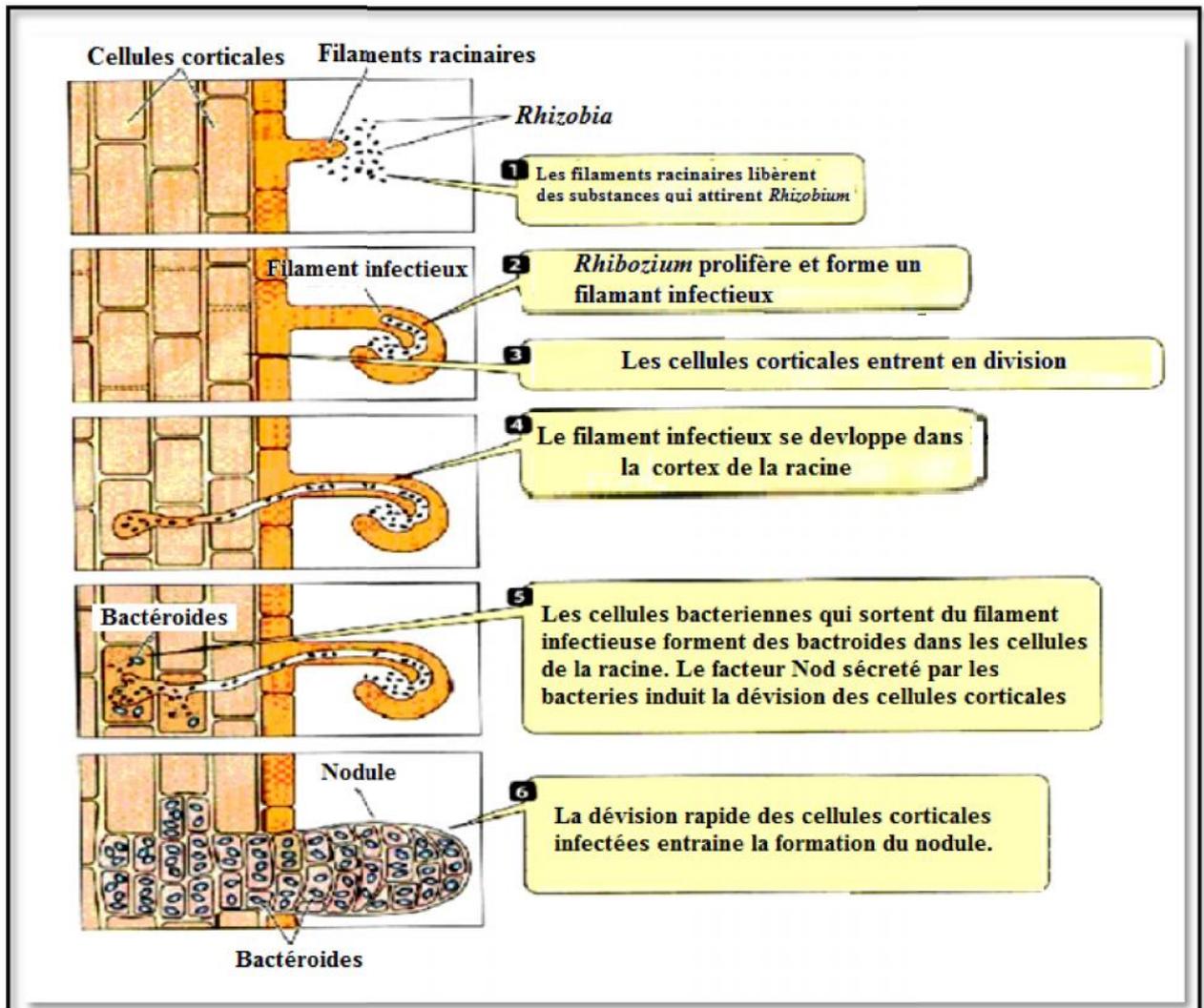
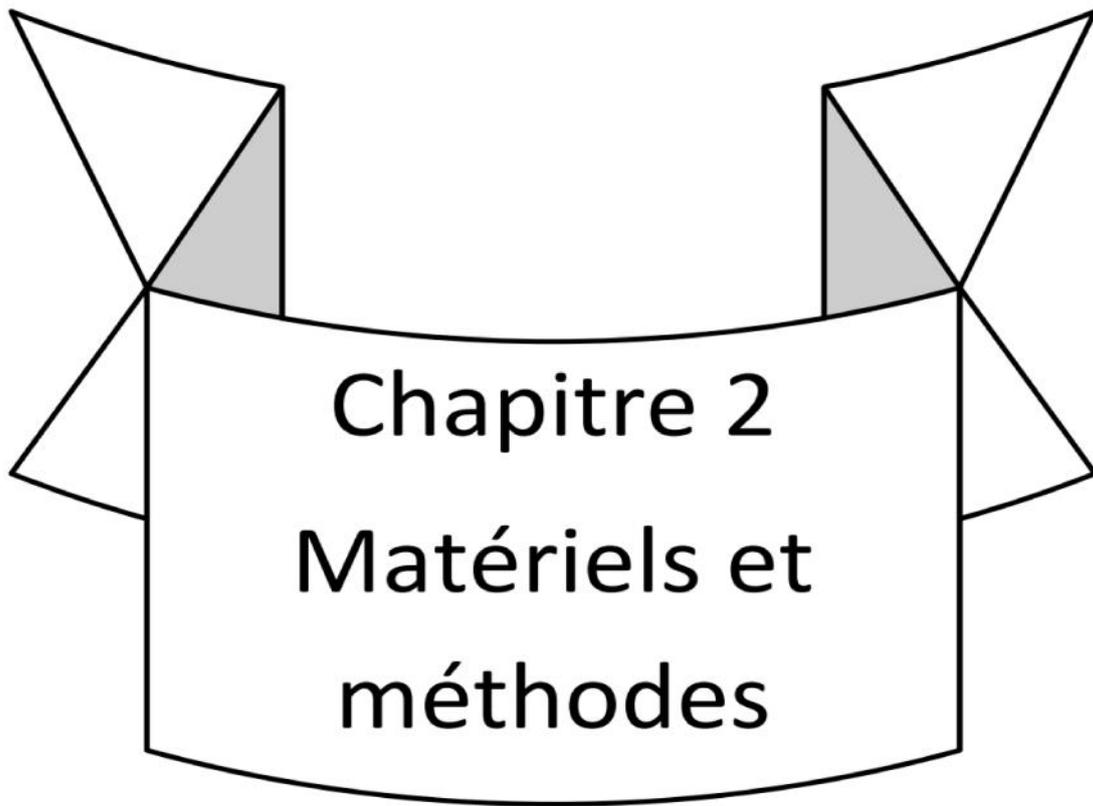


Figure 05 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004).



Chapitre 2
Matériels et
méthodes

1- Echantillonnage des nodules

Pour répondre à la problématique de la diversité bactérienne symbiotique associée à *Medicago sativa* L, une campagne d'échantillonnage a été conduite le mois de Mars sur deux régions dont : **El Attaf** (Latitude : 36° 13' 26" N ; Longitude : 1° 40' 19" E) et **Ain Lechiakh** (Latitude : 36.15848 ; Longitude : 2.40514)(figure 06). Le travail a été réalisé au niveau de laboratoire de recherche.

Le site a été choisi en fonction de l'objectif de notre sujet, visant la présence des plantes légumineuses, telle que *Medicago sativa* L.



Figure 06: Carte géographique de la wilaya d'Ain Defla représentant la localisation des sites d'échantillonnages. (Google earth).

2-Isolement des bactéries nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L)

2-1- Collecte des nodules

Les nodules ont été collectés à partir des plantes durant la saison de croissance végétative lorsque les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines. L'opération est effectuée selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben(1994)(figure 07):

- On creuse environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur pour extraire la plante et son appareil racinaire.
- On se débarrasse soigneusement du sol lié au niveau des racines pour ne pas endommager les nodules.
- Enfin on place le tout dans un sac en plastique.
- Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau courante pour éliminer toute trace de terre. Les nodules sont détachés à 1-2mm du site d'attache, puis rincés et séchés.



Figure 07: Les étapes de collecte de nodules à partir de *Medicago sativa* L

2-2 -Technique d'isolement des BNL

Les nodules sont immergés dans de l'hypochlorite de calcium pendant 2 minutes pour désinfecter la surface, ensuite ils sont rincés dix fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace du désinfectant. Les nodules stériles ainsi traités sont écrasés individuellement dans une boîte pétri stérile. On dépose quelques gouttes d'eau distillée stérile bien séparées, dans chacune d'elles puis un nodule sera écrasé avec une pince stérile (figure 08). L'extrait de chaque nodule est ensuite étalé sur une boîte de Pétri contenant le milieu YEM gélosé (annexe 1). Les boîtes ensemencées sont incubées à 28 °C pendant 5 à 10 jours.



Figure 08 : Technique d'isolement des bactéries nodulant la luzerne

2-3- Purification des isolats

De chaque boîte incubée, des colonies bien isolées sont repiquées sur milieu YEM et incubées à 28 °C pendant 48h à 72h. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de cultures pures. (Figure 09).

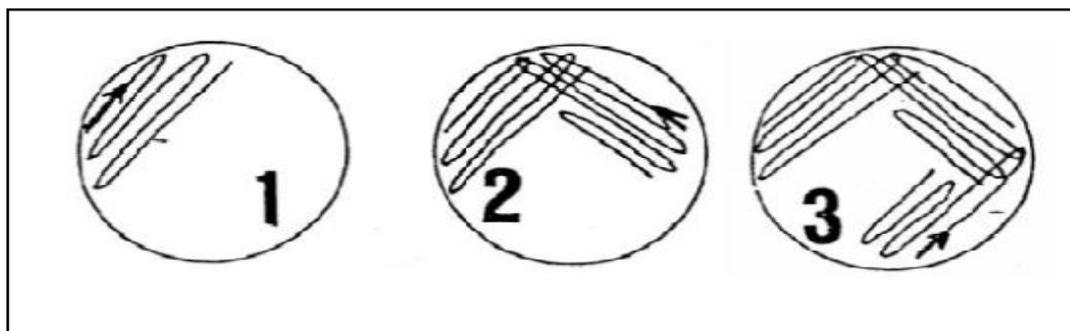


Figure 09 : Technique de purification

3-Conservation des isolats

Suite aux différentes étapes d'analyses précédentes, les isolats sélectionnés ont été maintenus à 4°C dans des tubes contenant du milieu YEM à gélose inclinée,

4-Caractérisation morphologiques des isolats

4-1-Etude macroscopique

L'observation macroscopique permet de déterminer la couleur, la taille, la forme, le contour des colonies ainsi que la pureté des isolats.

4-2-Etude microscopique

Après coloration de Gram (Annexe 02) les cultures sont examinées au microscope photonique pour déterminer le Gram, la forme des cellules le mode d'association et la pureté de la culture.

5- Test de bleu de bromothymol (BTB)

Chacune des isolats testées est mise en culture dans des boites de Pétri contenant du milieu YEM gélosé additionné de Bleu de Bromothymol à une concentration de 0.0025% (w / v), (Annexe 3) qui est un indicateur coloré de pH. Les boites inoculées ont été mises en incubation pendant 5 jours. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration de milieu .Une coloration jaune indique une réaction acide donc la souche appartient au bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et une coloration Bleu foncée indique une réaction basique donc la souche appartient au bactéries à croissances rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhium*)(Jordan 1984).

6- Caractérisation biochimiques

6-1- Test de la catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase : enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Le principe consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et de la mettre sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10 volumes. La mise en évidence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses.

6-2- Test de l'oxydase

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

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

6-3- Galerie API 20^E

Afin de caractériser les isolats biochimiquement un test sur galerie API 20 E a été réalisé selon le Protocole de bioMérieux. La galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substances déshydratés.

6-3-1- Préparation et inoculation de la galerie

La préparation de la galerie se fait d'abord par la répartition de 5 ml d'eau distillée dans les tubes à essai pour reconstituer les milieux. Pour préparer l'inoculum, il faut prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique préférentiellement des cultures jeunes.

- Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule.

- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).

- Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber la galerie .

Les cupules des tests d'assimilation sont inoculées avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs comme dans le cas des deux tests TDA et VP et le teste IND.

6-3-2-Lecture de la galerie

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

REFERENCES

7-Caractérisation physiologique

7-1-L'effet de pH

Des milieux YEM solides, sont préparés avec des différentes valeurs de pH (4; 5; 9 et 11), coulés dans des boîtes de Pétri, puisensemencés par les isolats étudiées et incubés à 28 °C pendant 72 heures.

7-2-L'effet de température

L'évaluation de la tolérance aux fortes températures a été effectuée par l'incubation des isolatsensemencés sur le YEM gélosé, aux différentes températures (4° C, 30° C, 37° C et 45° C) pendant 72 heures.

7-3-L'effet du NaCl

L'évaluation de la tolérance au NaCl a été effectuée par culture des isolats sur le YEM liquide renferme des teneurs croissantes de NaCl (0,3M, 0,4M, 0,6M, 0,8M, 1M,), L'incubation dure 72 heures à 28° C.

8-Etude de la sensibilité et de la tolérance des isolats aux antibiotiques

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

Technique de manipulation suivant CHABBERT, Y.A. (1972) : la boîte de Pétri gélosée est inondée avec 3 à 5 ml de culture bactérienne, on réaspire l'excès en inclinant la boîte dans plusieurs directions puis on applique les disques a 15 mm de la périphérie de la boîte en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu.

-Après l'application, les boîtes sont laissées pendant 30min puis incubé à 28° C pendant 72h.

- Les différents diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés.

-Les bactéries sont classées dans les catégories suivantes : résistantes, et sensibles.

Tableau01 : Les antibiotiques utilisés avec charges des disques.

Antibiotique testes	Le signe	Charge dudisque
Nalidixic acide	NA	30µg
Ampicilline	AMP	30µg
Tétracycline	TE	30µg
Erythromycine	ERY	15µg
Streptomycine	SMN	10µg
Rifamycine	RAM	30µg
chloramphenol	CHL	30µg

9-Authentification des isolats

La capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines des légumineuses hôtes est un critère de base dans la caractérisation de rhizobia (Graham *et al.*, 1991). Afin de confirmer l'aptitude réelle des isolats à noduler la plante hôte, nous les avons testées en les inoculant à de jeunes plants de *Medicago sativa* L.

9-1-Germination des graines

Après sélection des graines saines de *Medicago sativa* L nous avons procédé à leurs stérilisations en surface selon le protocole suivant :

Les graines sont mises dans un bain de l'hypochlorite de calcium à 3% pendant 3 à 4 min ; Ceci est suivi d'un très bon rinçage abondant, pour éliminer toute trace du désinfectant. En suite elles sont mise en imbibition dans l'eau distille stérile pendant une nuit à 4 °C, puis mises à germer à l'obscurité à (25°C) dans desboîtes Pétri contenant l'eau gélosé à 1%.

9-2-Culture des plantules

9-2-1-Préparation des tubes de cultures

Des tubes à essai qui contient du papier kraft sont remplis jusqu'au bout par la solution nutritive pour plantes dépourvue d'azote(Bertrand, 1997), (Annexe 04), la partie supérieure des tubes est fermée avec du papier aluminium maintenu par un élastique, puis ils sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min.(figure10).



Figure 10: préparations des tubes de cultures

9-2-2-Mise en culture des plantules

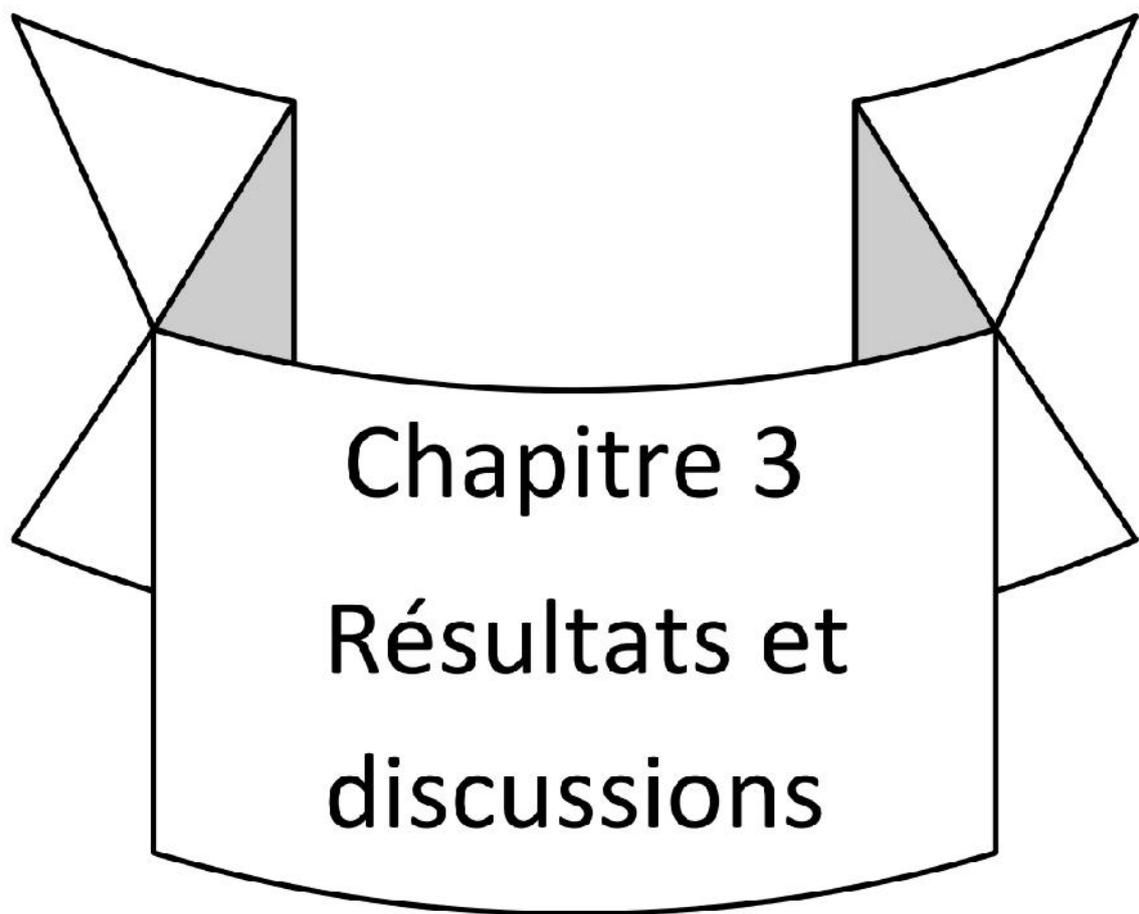
La racine de chaque plantule d'une taille de 1 à 2 cm est introduite en tube, à travers du papier aluminium stérilisé à l'éthanol (70%) et percé par une pointe rougeie à la flamme. Les tubes sont ensuite déposés en chambre de culture.

9-2-3-Inoculation des plantules

Après deux jours de croissance, les jeunes plantes sont inoculées indépendamment à l'aide d'une seringue stérile par 1 ml de suspension bactérienne en phase exponentielle de la croissance de chaque souches mise en culture dans du YEM liquide.(Figure 11) ,un traitement témoin non inoculé est réalisé.



Figure 11 : l'inoculation des plantules



Chapitre 3
Résultats et
discussions

1-Phénologie de la nodulation de *Medicago sativa* L

Les nodules observés ont une morphologie caractéristique de la plante hôte notamment ; l'aspect lobé et bilobé. Généralement les petites nodules sont assez souvent arrondies, blanchâtre tandis que les plus anciens acquièrent des tailles différentes (varie de fraction du millimètre au centimètre). L'ensemble de ces observations confirme bien le fait que la morphologie des nodules soit déterminée par l'espèce végétale et ne dépend pas de la souche de *Rhizobium* (Nutman, 1959 ; Dart, 1977 ; Rasanen, 2002). (Figure 12)

La couleur extérieure des nodules observés varie entre le blanc et le marron. Cloonan (1963) et Doberiner (1965) soulignent que la couleur des nodules n'est pas liée à celle de la racine. Elle dépend beaucoup plus de la qualité physico – chimique du sol et de présence de la lèghémoglobine dans le nodule

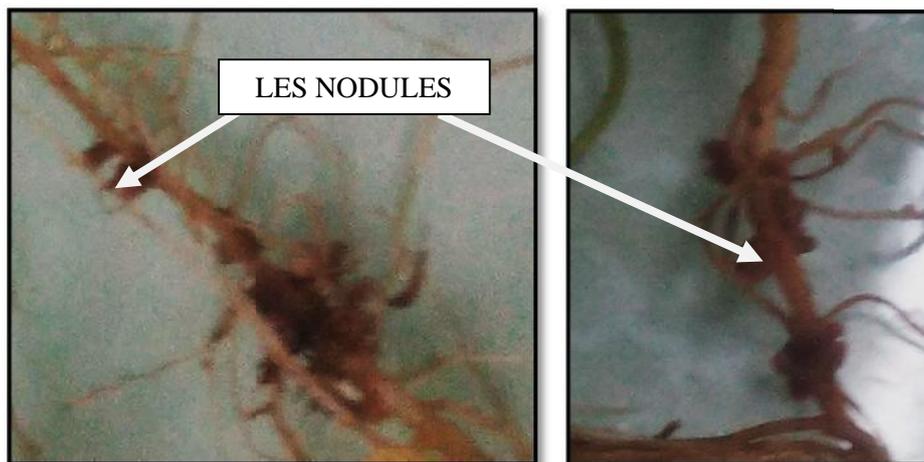


Figure 12: Aspects des nodules observés sur les racines de *Medicago sativa* L.

2-L'isolement bactérien à partir des nodules

Des colonies bactériennes rappelant les *Rhizobiums* sont obtenues après ensemencement du broyat des nodules sur YEM (72 heures d'incubation à 28° C). Vu la diversité des microorganismes observés on a procédé à des purifications par passages successifs sur milieux solides (figure 13) pour enfin purifier les souches de *Rhizobium*.

On a choisis les isolats du genre *Rhizobium* en se basant sur:

1-Le temps d'incubation (72 heures).

2-forme des colonies: colonies muqueuses, bombées, circulaires et Brillantes aspect mielleux.

Cette opération, nous a permis d'obtenir une collection de huit souches (RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, RH6, RH7 et RH8)

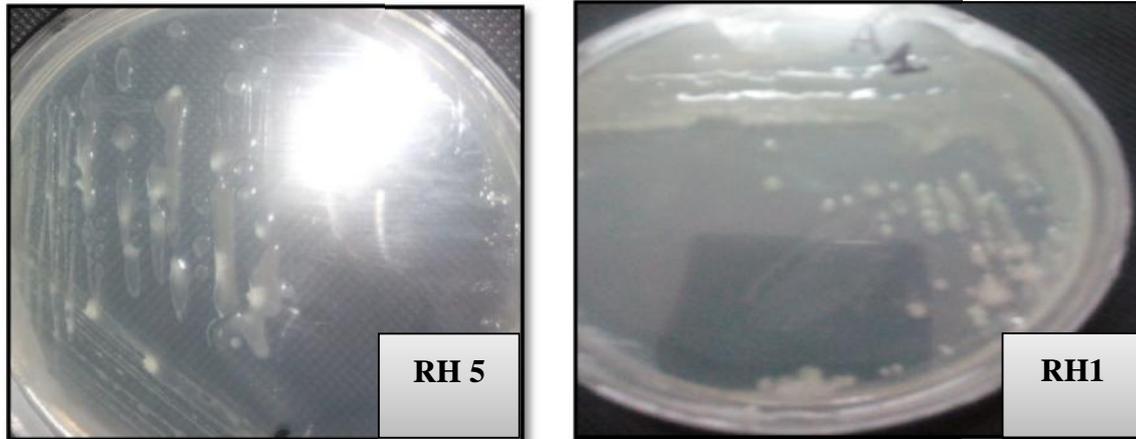


Figure 13: aspect macroscopique de quelques colonies de Rhizobia après 3 jours de culture sur YEM à 28°C (résultats de première purification).

3- Caractérisation morphologiques

3-1- Etudes macroscopique

Au bout 3 à 5 jours, une croissance très importante est détectable sur milieu YEM. Les colonies formées par les souches isolées des nodules de la luzerne ont bien poussé sur le milieu YEM (figure 14) apparaissent homogène le long de stries. Elles sont circulaires de 2 à 4 mm de diamètre et présentant les caractéristiques morphologiques des rhizobia décrites par Dommergues et Mangenot (1970) et Lajudie *et al.* (1994).

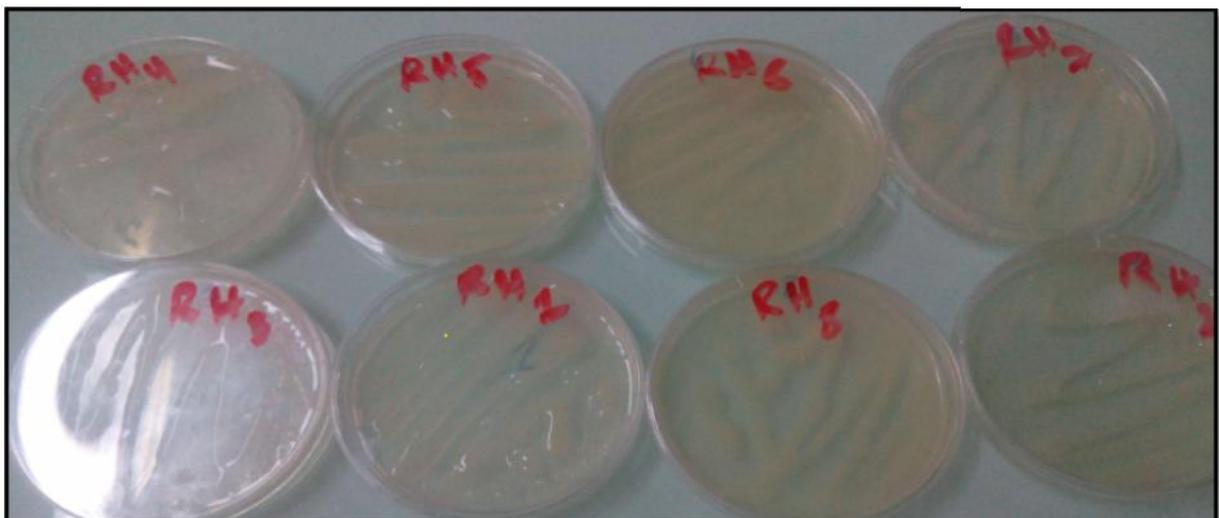


Figure 14: Résultats d'isolement et purification d'isolats.

La plupart des colonies sont de couleur blanchâtre à crème, sous forme ronde avec un contour régulier, une surface bombée et lisse. Elles sont translucides, avec une texture

homogène et marquées par une forte viscosité qui augmente avec le temps d'incubation notamment RH1, RH3, RH4 ,RH5 , RH 7 et RH8 (figure 15) .Cette viscosité est moins important chez certaines souches comme RH5 , RH2 et RH6 .Selon **Upchurch et Elkan (1977) , Bekki(1986) , Tao(1994) et Zahran et al.(1994)** la viscosité des colonies et dus à une production massive d'exopolysaccharides qui peuvent avoir un rôle dans la tolérance des souches de rhizobia à la salinité.

Selon **Rosenberger et al, (2004)** les lipopolysaccharides (LPS) des *Rhizobium* sont d'importants facteurs de virulence, permettant de surmonter les mécanismes de défense du pathogène, ils jouent un rôle important dans la suppression des champignons qui est accompagnée d'une perte intracellulaire de survie qui réduit ainsi fortement la virulence des souches. **Abramovitz et al., (2004)**, montrent que dans le cas des *Rhizobium*, les LPS se distinguent comme substance antifongique, alors que **Chakraborty et Chakraborty, (2006)** ont constaté que le *Verticillium alboatrum* et le *F.oxysporum* ont été inhibés respectivement par 7, 6 et 7,8% des isolats de *Rhizobium* grâce à leurs productions de polysaccharides. Une production d'amylases par des souches indigènes (brésil) à partir de différents substrats carbonés a été rapportée par de **Oliveira et al., (2007)**.

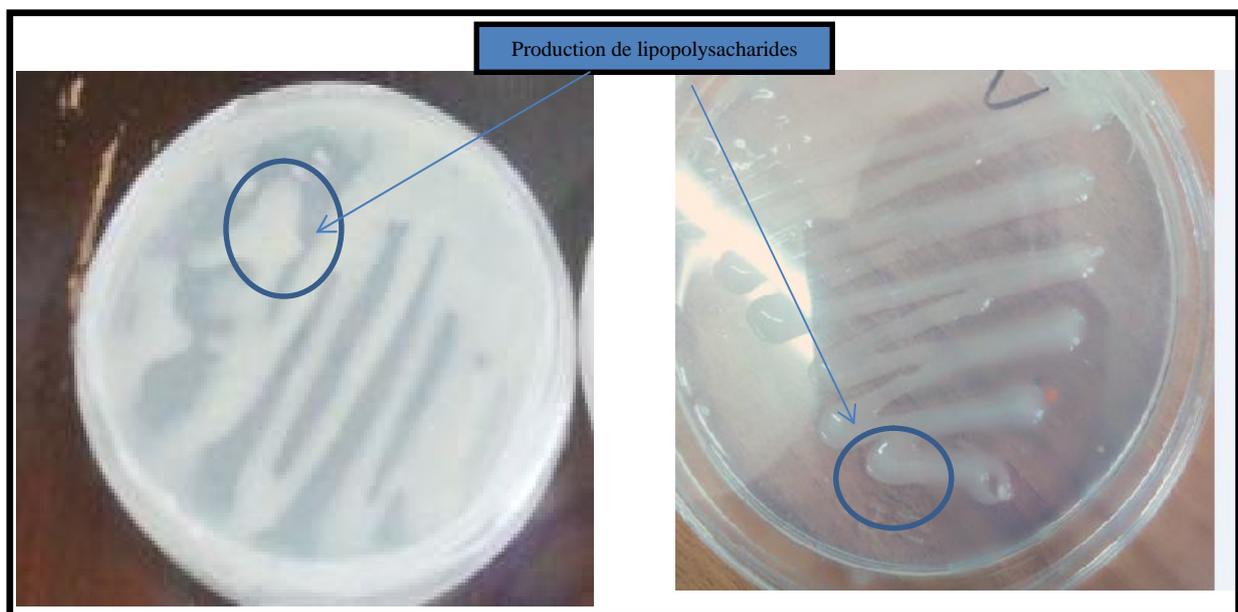


Figure 15: Exemple de production de polysaccharides par les isolats : Rh8, Rh4.

3-2-Etude microscopique

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram a été réalisée, qui va permettre de visualiser les bactéries au microscope optique. L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets de taille différente et des bacilles roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (figure 16).



Figure 16: aspect microscopique des souches *rhizobium* Rh 1 Observation (G×100) au microscope optique.

4- Test de bleu de bromothymol (BTB)

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).

Dans notre cas on observe un virage de couleur du bleu vers le jaune pour les isolats RH1, RH4, RH5. Ce virage de couleur après 3 jours d'incubation signifie une acidification du milieu ce qui prouve que ces isolats ont une croissance rapide (Beck *et al.*, 1993), contrairement aux souches RH2,RH3, RH6, RH7 , RH8 (figure 17) à croissance lente (croissance après 5 jours) qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan., 1984 ; Beck *et al.*, 1993 ;Pagano., 2008).

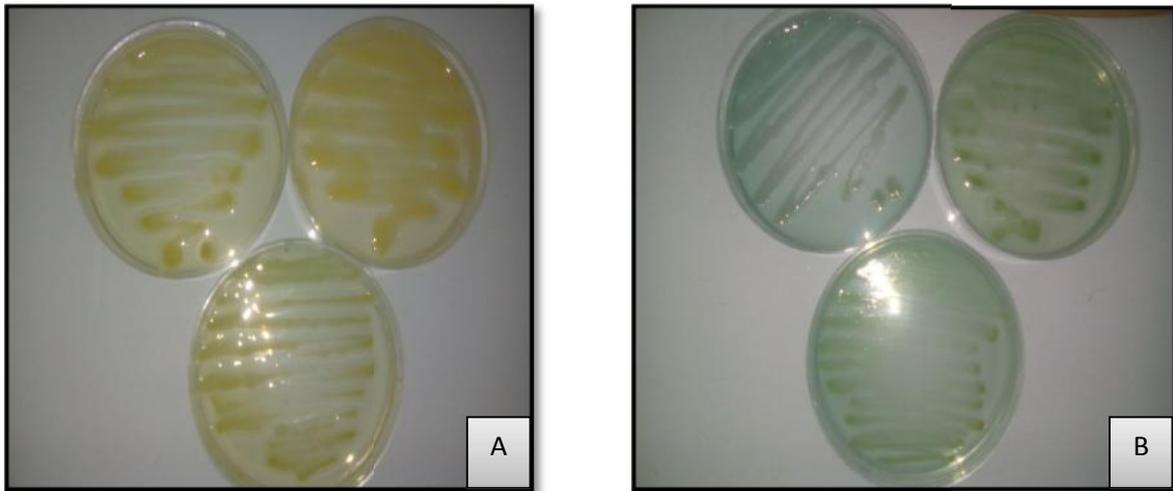


Figure 17 : aspect macroscopique de la croissance de quelques souches sur milieu de culture YEM + bleu de bromothymol à 28 ° C pendant 72 heures.

A : effet d'acidification

B : effet d'alcalinisation

5- Caractérisation biochimiques

5-1- Test de catalase et oxydase

L'ensemble des souches étudiées catalase et oxydase positives; les *Rhizobium* sont des bactéries aérobies.

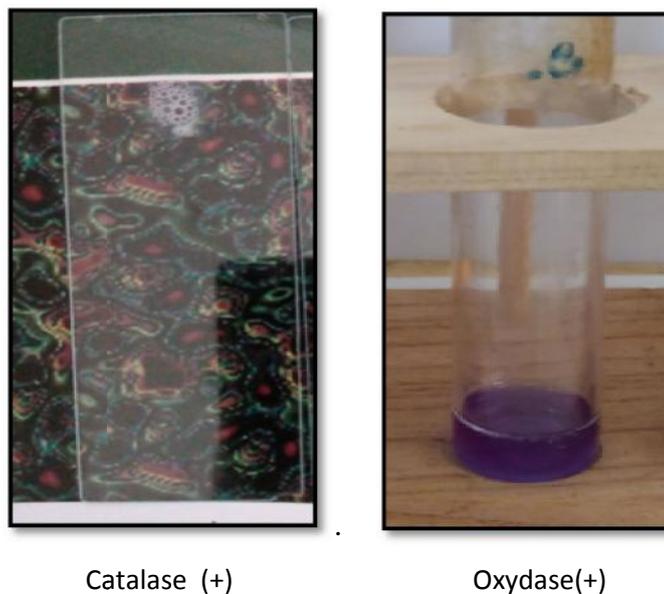


Figure 18 : Résultats de Test de catalase et oxydase

5-2-Galerie API 20^E

20 tests biochimiques ont été réalisés sur huit souches étudiées .Ce test est réalisé dans le but de voir la source carbonée préférée par les différentes souches étudiées, il est l'une des bases de l'identification biochimique. Les résultats sont récapitulés dans le (Tableau 2 et figure 19).

Tableau 2 : résultats de la caractérisation biochimique (la galerie)

SOUCHE	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	LAC	MEL	AMY	ARA
Rh1	+		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Rh2	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Rh3	+		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Rh4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
Rh5	+		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Rh6	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Rh7	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Rh8	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

5-2-1-Résultats des tests conventionnels

Le test de ONPG montre que toutes les souches possèdent l'enzyme -galactosidase sauf la souche RH4 et RH6. Cependant l'arginine n'est hydrolysé que par les souches RH2, RH 6 qui sont capable aussi de transformé la lysine (acide aminée) par la lysine décarboxylase.

La formation d'acide indole pyruvique à partir de tryptophane (acide aminée) grâce à la tryptophane désaminase est réalisée par les souches RH2 RH6 et RH7.

Les tests de la production du sulfure d'hydrogène (H_2S) à partir du thiosulfate (S_2O_3) et la libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase ainsi que la transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine decarboxyle n'est réalisée par aucune souches contrairement au test d'assimilation de trisodum citrat, comme seule source de carbone appelé aussi le citrate de sodium, qui s'est révélé positif chez toutes les souches.

La présence d'une gélatinase (protéine) a été révélée par la diffusion du pigment, le résultat est positif pour toutes les souches à l'exception des souches RH1 et RH3.

Le test de Voges Priskauer. Montre que les souches Rh 2 Rh6 Rh8 capables de produire l'acétoïne à partir du pirivate de sodium.

5-2-2 .Résultats des tests de métabolisme des glucides

L'utilisation des glucides comme seule source de carbone et d'énergie a été également étudiée, 09 sucres ont été utilisé qui sont : D-glucose, L'arabinose, Rhamnose , D-mannitol (polyol) , Inositol , Sorbitol , Mélobiose , Amygdaline , Sucrose.

Le tableau 2 montre que :

- Les souches utilisent différemment les sucres.
- Toutes les souches dégradent préférentiellement et rapidement le mannitol (polyol),
- Le glucose (monosaccharide) et le Sucrose et l'Amygdaline est dégradé par la moitié du des souches (RH2, RH6, RH7, RH8).
- Le sorbitol (polyol) est dégradé par une seule souche qui est la RH6.
- L'inositol n'est pas dégradé pas par toutes les souches.
- Le Mélobiose est dégradé par les souches RH2, RH7, RH8.
- L'Arabinose est dégradé par les souches RH 2 RH 5 RH 6, RH7, RH 8.
- Le Rhamnose est dégradé par deux souches : RH 7 RH8.

Vessey,2006 ;Brigido et al.,2006) . Dans cette partie, l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la croissance des souches bactériennes a été étudié.

6- 1-L'effet de pH

Une croissance optimale de la majorité des isolats est observée entre 6.8 et 8 (pH neutre) ainsi qu'au pH alcalin cependant au pH acide, on observe une croissance moindre. Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de la croissance des *rhizobiums* est entre 6 et 7. Les rhizobiums adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acides du sol (Zahran., 1999).

Toutes nos souches ont toléré des PH jusqu'à 11(Figure 20) .L'alcalinité est moins néfaste pour la survie des *Rhizobiums*. Jordan (1984) a montré que la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9, L'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du *Rhizobium* et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (AppunuetDhar., 2006).

D'après El-Hilali (2006) la tolérance des souches à l'acidité est peut être due au pH acide du milieu d'isolement de ces souches. Raza et al. (2001) ont montré que les souches de *Rhizobium* isolées des nodules *Lupinus albus* de l'Egypte tolèrent des pH extrêmes dont l'intervalle allant de 4 à 10.



Figure 20: Aspect macroscopique des quelques souches a différents pH (photo originale).

6-2- L'effet de température

Ce test a été effectué dans l'objectif de déterminer la croissance des souches à différentes températures, et de se fait sélectionner ceux qui présentent une croissance à des températures extrêmes.

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YEM, les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 4°C (figure 21), avec un optimum de croissance entre 28°C et 31°C.

Notre résultat montre que :

-Pour la température de 37 °C la plupart des souches ont poussé à l'exception de RH3, RH7, Par contre à la température de 4°C seul les souches RH1, RH3, RH7 ont poussé .selon **ZAHRAN (1999)** l'intervalle de température de croissance pour la plupart de rhizobiums est de 28°C à 31°C.

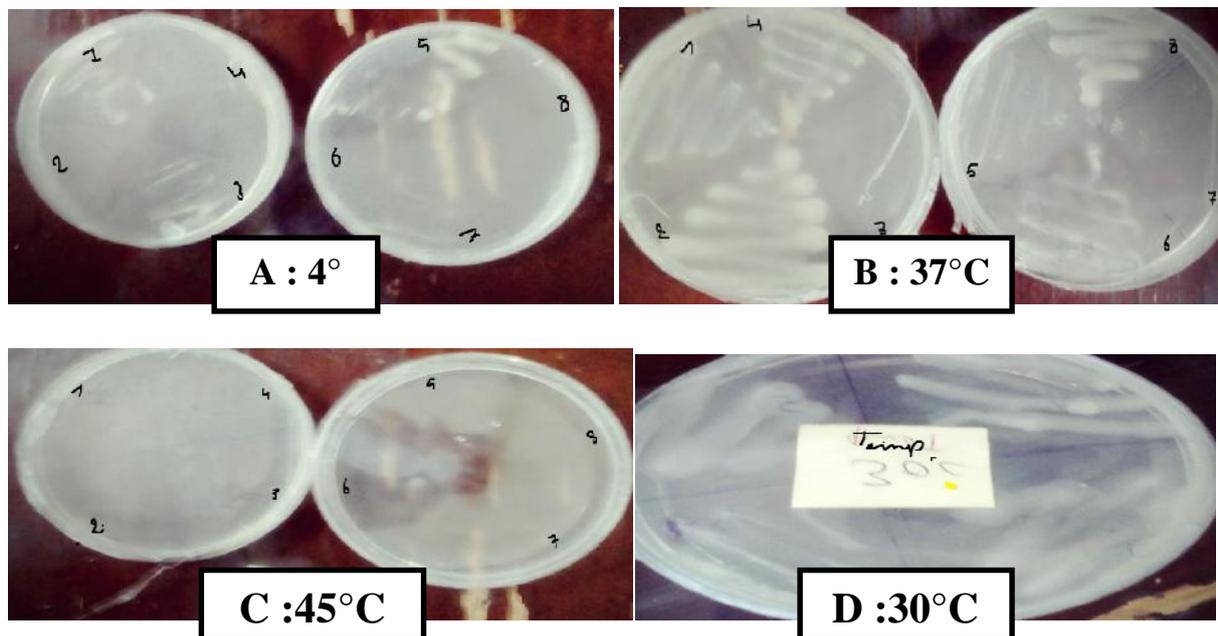


Figure 21 : aspect macroscopique des souches à différentes températures

Parallèlement à nos résultats **Bordeleau et al (1994)** rapporte que les rhizobia sont tolèrent aux basses températures de l'ordre de 4°C 5°C. (Figure 22)

En ce qui concerne la température de 45°C nos isolats ne présentent aucune croissance. Mais il 'y a des études qui ont montré que les rhizobia de légumineux ont l'aptitude de tolérer une température de 40°C (**Lajudie et al., 1994 ; Zahran et al., 1994 ; Missbah El Idrissi., 1996**).

Notre résultats rejoignent ceux de Moawad et Beck (1991) ; Jordan (1984) ; Graham(1992) qui montrent que les rhizobia cultivent bien entre 20°C et 40°C.

Les souches qui résistent à températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique, cette thermorésistante est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räzänen., 2002).

Lipsanen et Lindström (1989) montrent qu'il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques.

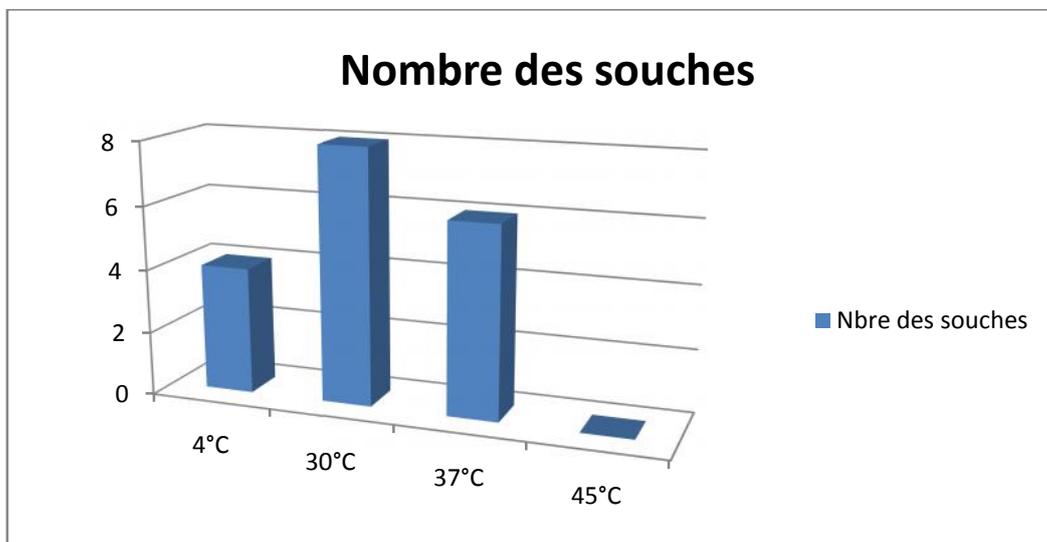


Figure 22:Évaluation de la croissance des isolats de *Medicago sativa* L. à différents températures.

6-3- Tolérance au NaCl

Les effets du NaCl semblent être un bon indicateur de la réponse des rhizobiums aux conditions de salinité différentes (Diez *et al.*, 2009) Nous avons observées une bonne croissance à des concentrations de NaCl variant de 200 mM à 600mM (Figure 23) , a l'exception des isolats RH2 et RH6 qui n'ont pu se développer qu' a 400 mM de NaCl ces résultats sont en corrélation avec les rapports intérieurs sur les souches de genre *Sinorhizobium* isolés des légumineuses sauvage en Tunisie (Zakhia *et al.* , (2004) ;Zribi *et al.* ,2004 ;Mahdhi *et al.* ,2007 ; Mahdhi *et al.* ,2008) .

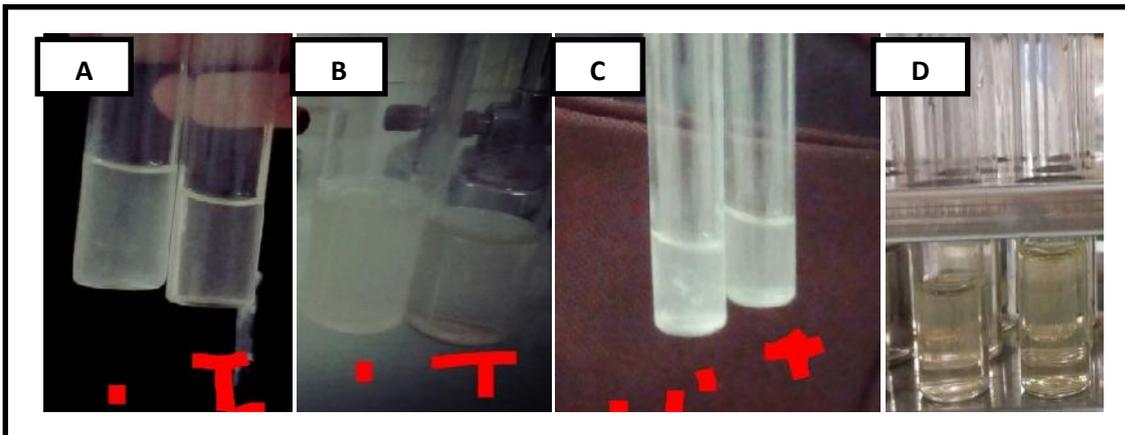


Figure 23: aspect macroscopique des souches a déférent concentration de NaCl

A : 600 mM B :200 mM C :400mM D :800mM.

A partir de 600mM la croissance de ces souches est inhibée. Serraj *et al* (2004) montrent que la sensibilité des souches de *Rhizobiums* à la salinité varie d'une souche à une autre (Figure 24).

La salinité diminue la survie des rhizobia et inhibe l'expansion et la courbure des poils absorbants ainsi que la fixation des rhizobia sur les poils semble être sensible au stress salin, ce qui entraîne une réduction du nombre de ces organes symbiotiques (Saadallah *et al* , 2001 ; Benkhaled.2003) et affecte également le processus de nodulation en retardant l'initiation ou la croissance de nouveau nodules ainsi que la fixation symbiotique de l'azote (Roe *et al.* , 2002) .

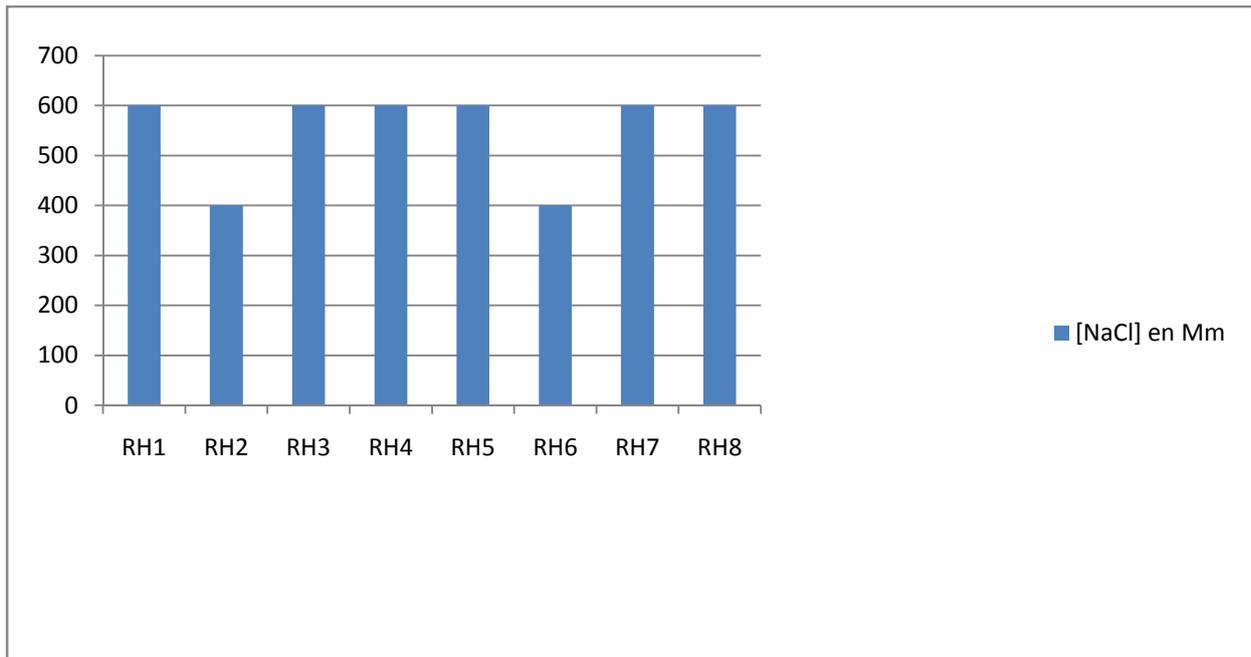


Figure 24: seuil de la tolérance des isolats de *Medicago sativa L* au stress salin.

7-Etude de la sensibilité et de la tolérance des souches aux antibiotiques

Les tests d'antibiotique ont permis d'établir le spectre de résistance de chacune des isolats. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus mesurés autour des disques d'antibiotiques testée sont représentée dans le (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats du test de sensibilité et de tolérance des souches aux antibiotiques

Antibiotique \ Souche	Souche							
	Souche 1	Souche 2	Souche3	Souche4	Souche 5	Souche6	Souche7	Souche8
Ampicilline	11 mm	0 mm	30 mm	0 mm	0 mm	6 mm	20 mm	25 mm
Nalidixic acide	36 mm	0 mm	0 mm	0 mm	30 mm	15 mm	24 mm	30 mm
Streptomycine	0 mm	22 mm	0 mm	22 mm	15 mm	15 mm	15 mm	15 mm
Rifamycine	0 mm	28 mm	15 mm	0 mm	30 mm	0 mm	15 mm	20 mm
Erythromycin	0 mm	0 mm	24 mm	0 mm	0 mm	0 mm	5 mm	12 mm
Tetracycline	0 mm	0 mm	35 mm	0 mm	40 mm	0 mm	20 mm	23 mm
Chloramphenol	10 mm	0 mm	25 mm	10 mm	10 mm	10 mm	5 mm	30 mm

- La sensibilité intrinsèque aux antibiotiques révèle que la souche RH7 et RH8 sont sensibles à toutes les antibiotiques testés.
- Pour l'Acide Nalidixique, RH1, RH5, RH6, RH7, RH8 sont sensibles, les autres sont résistantes.
- Pour la Streptomycine, RH1 RH3 sont résistantes, les autres sont sensibles.
- Pour l'ampicilline, RH2 RH4 RH5 résistantes, les autres sont sensibles.
- Pour la rifamycine RH1 RH4 RH6 sont résistances, les autres sont sensibles.
- Pour Erythromycine RH1 RH2 RH4 RH5 RH6 sont résistances, les autres sont sensibles.
- Pour Tétracycline RH1 RH2 RH4 RH6 sont résistances, les autres sont sensible.
- Pour Chloramphenol toutes les souches est sensible sauf la souche 2.
- La Pénicilline et l'ampicilline sont connues par l'empêchement de la formation de la paroi cellulaire surtout chez les Gram- (**Stanieret *al.*1976**).

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

Quelques exemples des comportements des souches de *Rhizobium* à certains antibiotiques sont donnés sur la figure (25), on remarque de bonnes zones d'inhibition en nombre et en importance du diamètre d'inhibition.

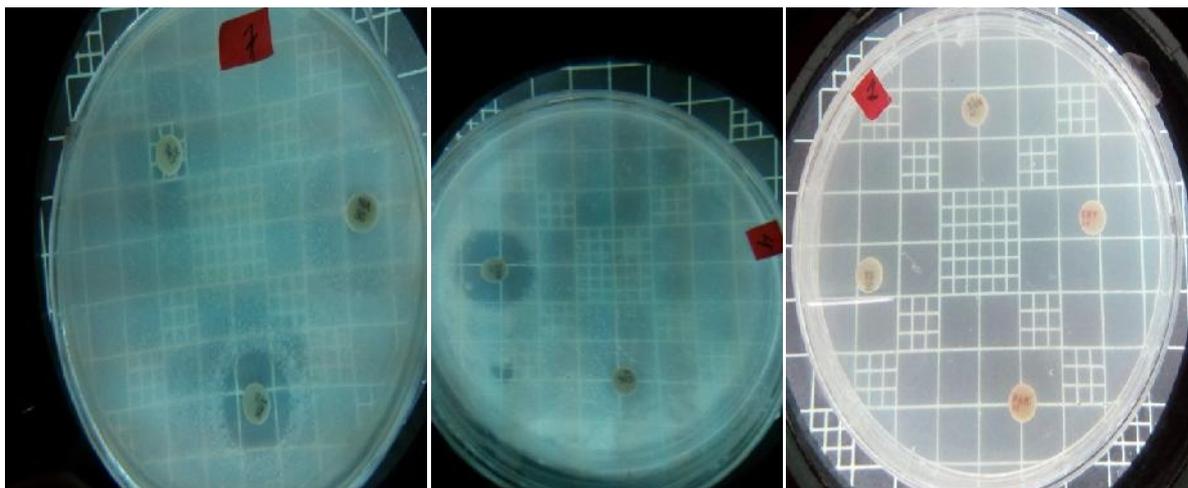


Figure 25: l'effet des antibiotiques sur le comportement des souches isolées de *Medicago sativa* L.

Nos résultats indiquent la large variabilité de résistance aux sept antibiotiques étudiés, (figure 26), et suggèrent qu'il est possible de sélectionner des *Rhizobiums* avec de fortes compétences de compétitivités, dans les zones d'étude, ces souches peuvent être utilisées comme des inoculant pour réussir une bonne productivité de légumineuses.

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

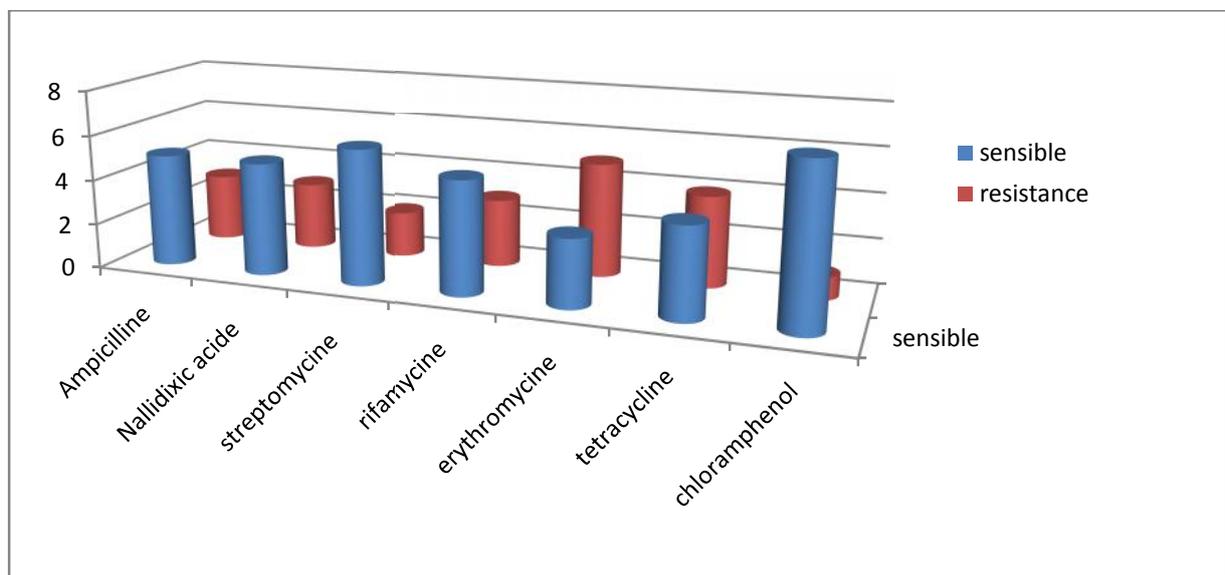


Figure 26: Histogramme des résistances et des sensibilités aux antibiotiques.

8-Authentification des isolats

8-1-Propriétés germinatives des graines de *Médicago sativa* L

Le résultat obtenu mis en évidence l'effet prétraitement qui a une rôle très significatif pour la germination des graines on enregistre un taux de germination de 100 % (racines de 1 à 2 cm de longueur) (figure 27).

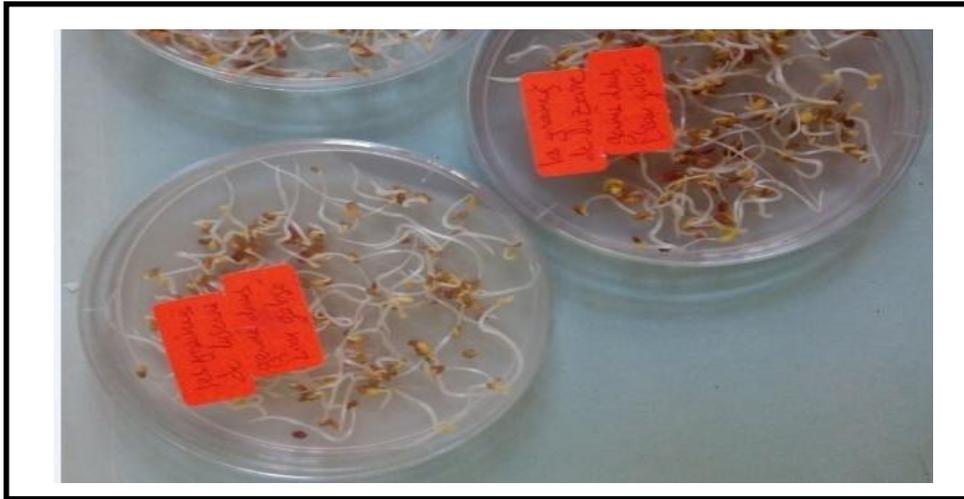


Figure 27: Aspect des graines de *Medicago sativa* L .germées après 72h de croissance à température ambiante.

8-2-Test de nodulation

Dans cette expérience, les graines en germination de *Medicago sativa* L ont été mises en culture en hydroponie, dans des tubes contenant une Solution nutritive de culture des plantes dépourvu de l'azote (Bertrand , 1997) et inoculer individuellement avec notre culture bactériennes. Après cinq semaines de croissances, l'effectivité a été observée chez les plantes de la luzerne inoculée par les huit souches .La croissance des plantes est nettement améliorée comparer aux témoin (Figure 28).elle est déterminée en fonction de la hauteur de la partie aérienne et racinaire environ deux fois plus élevée que les plantes non inoculé surtout les plantes qui etaient inocules par les souches RH5 ,RH 4 ,RH 3,RH 7 ,RH 8, cependant l'ineffectivité des souches est déterminée en fonction de nombre de nodules formés (figure 29).

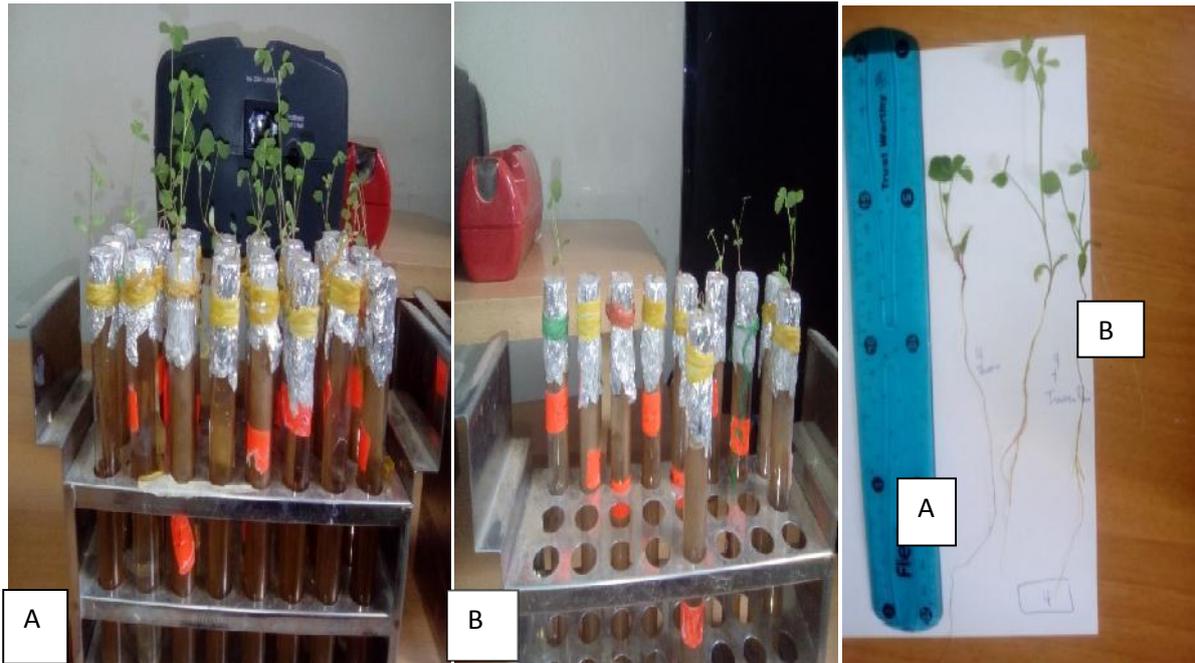


Figure 28 : l'effectivité d'inoculation de plantules A : (plants inoculé) biomasse importante et coloration vert foncé. B : (plants non inoculé) biomasse faible et coloration vert clair.

Les souches testées sont capable de nodulées, à l'exception de la souche RH2 et de la souche RH5, RH3 qui sont incapable de formées les nodules mais il a été possible de mettre en évidence un effet positif sur la croissance des plantes.

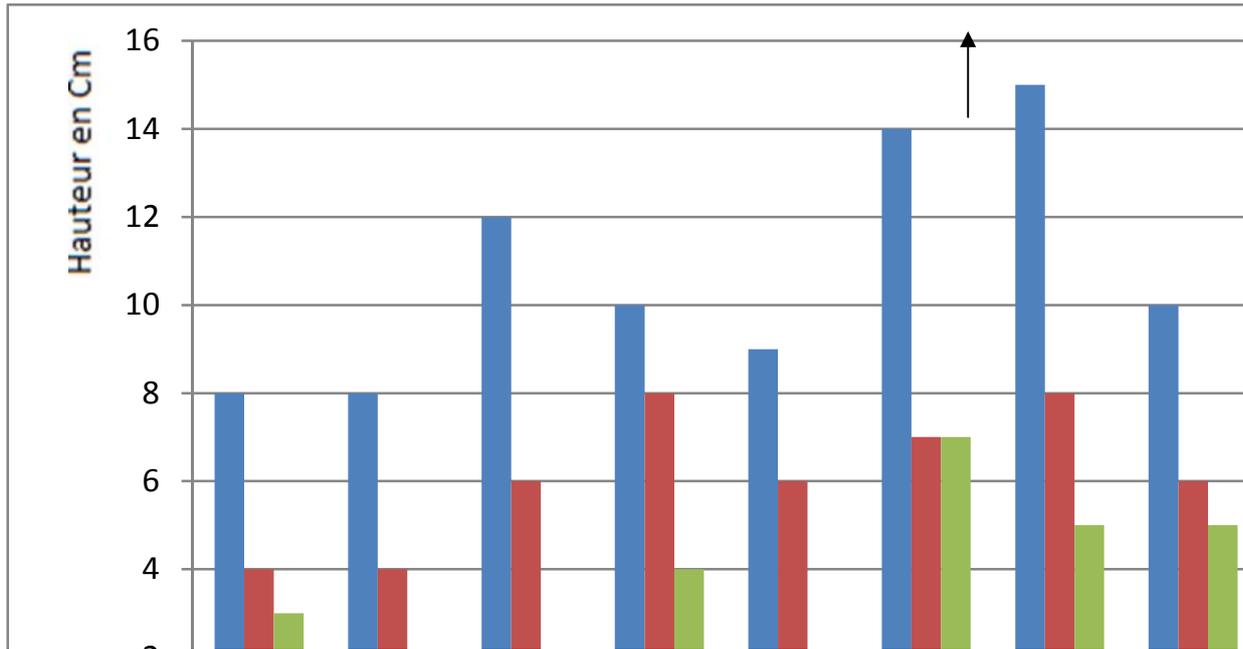


Figure 29: effectivités des isolats de *Medicago sativa* L. (Plantes inocules)

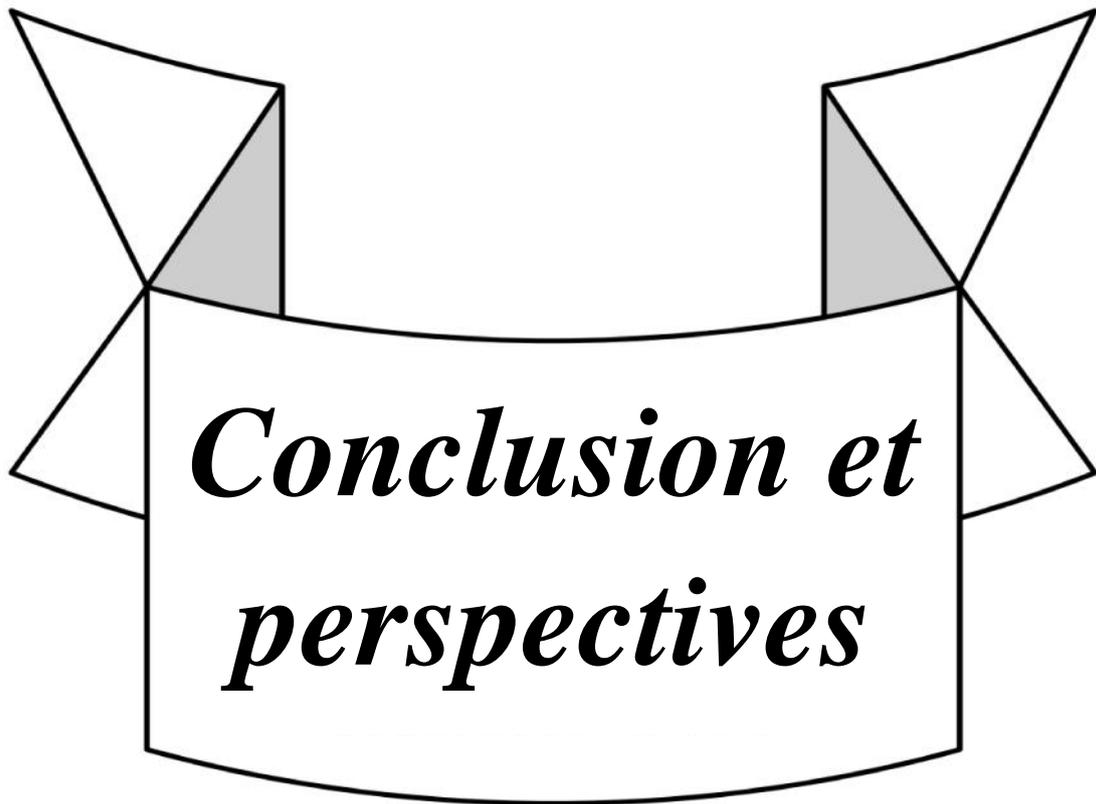
Selon un certain nombre d'études récentes, il existe quelques bactéries du sol qui stimulent la croissance des plantes sans pour autant former des symbiose. Mais les mécanismes impliqués dans cette étude ne sont pas clairement élucidés (Gray et Smith, 2005). Le premier mécanisme qui a été proposé pour expliquer le gain de croissance de la plante est l'enrichissement de la rhizosphère en N par les bactéries libres alors que le second proposé est la stimulation du métabolisme hormonal de la plante (Steenhoudt et Vanderleyden., 2000).

Nous avons détecté la formation de peu de nodules avec petit taille sur les racines des plants testés. La formation des nodules indique que nos isolats sont infectifs et elle (cette formation) confirme la relation symbiotique entre la plante hôte et le micro-symbiont qui est une relation spécifique.(figure 30)

Les gènes responsables de la nodulation sont portés sur un plasmide nommé *Sym* (Wang et al., 1999). Donc son absence influence l'organogénèse des nodules.



Figure 30: Aspect des nodules obtenus lors du test de nodulation.
(Racines de *Medicago sativa* L nodulées par RH7)



***Conclusion et
perspectives***

La fixation biologique de l'azote, opérée par le système Légumineuse – BNL permet aux légumineuses de coloniser des milieux dégradés ou pauvres et d'enrichir le sol en matière azoté organique (engrais naturel), facilitant ainsi l'implantation d'autres espèces végétales et la réhabilitation de l'écosystème dégradé.

Notre présente étude consiste à initier l'évaluation de la biodiversité des bactéries symbiotique dans le cadre de l'amélioration de la productivité des légumineuses par l'optimisation de la fixation azotée.

Nous sommes procédés à un isolement et une caractérisation de huit souches prévenant des nodules de *Medicago sativa* L. Selon les techniques usuelles propres aux rhizobia décrites par Vincent., (1970); Somasegaran et Hoben., (1994).

L'étude des caractéristiques phénotypiques a permis, d'une part, de déterminer le niveau de variabilité morphologique entre les huit souches isolées et d'autre part, d'évaluer lecomportement de ces huit isolats aux différentes conditions environnementales.

L'étude de la croissance des souches a été réalisée sur milieu YEMliquide et solide additionne de bleu de bromothymol. Les résultats obtenus ont montré que les souches étudiées sont à croissance lente et rapide présentent des aspects morphologiques et culturaux suggérant leur appartenance au genre *Bradyrhizobium* à croissance lente et le genre de *Rhizobuim* et *Agrobacteruim* à croissance rapide.

L'étude des facteurs abiotiques (NaCl, pH et température) fait ressortir que: Les souches testées peuvent pousser dans un large intervalle de température compris entre 4°C et 37°C avec une température optimale de croissance entre 28°C .ce qui confirme une grande variabilité de la thermo-tolérance des souches. Au-delà d'une concentration de 600 mM de NaCl la croissance des souches est remarquablement inhibée. La caractérisation biochimique a révélé une variabilité de comportement vis-à-vis les tests effectués.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition a permis de déterminer la résistance des souches aux antibiotiques. En effet les résultats indiquent la large variabilité de résistantes aux sept antibiotiques étudiés.

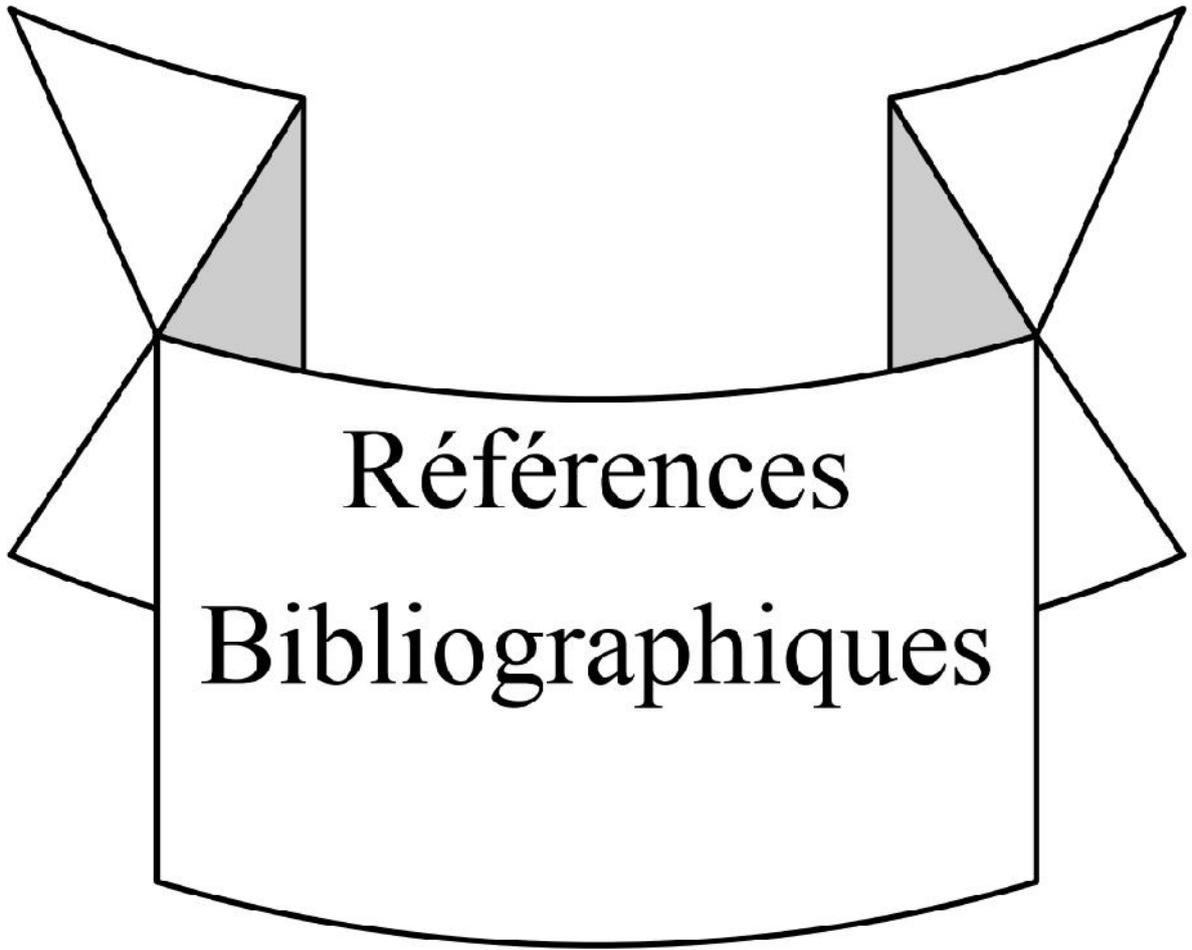
Nos souches ont été authentifiées par inoculation des plantules de *Medicago sativa* cultivées en milieu hydroponique stérile. L'effectivité a été observée chez les plants et

déterminée en fonction de la hauteur de la partie aérienne et racinaire. Les plants inoculés avec les isolats testés ont une hauteur de parties aérienne environ deux fois plus élevée que les plants non inoculés.

Les travaux présentés dans cette étude s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration de la production des légumineuses alimentaires et fourragères en Algérie sous contraintes environnementales climatiques. La fixation biologique de l'azote moléculaire par la symbiose *Rhizobium*-légumineuse présente un intérêt économique et agronomique considérable.

En perspective, il serait intéressant de:

- Continuer la caractérisation phénotypique par des tests d'assimilation des sources de carbone et d'azote, l'effet des métaux lourds et des pesticides sur la croissance des rhizobia et d'élargir la gamme de plantes utilisées.
- Compléter cette étude par une analyse moléculaire et génotypique des rhizobia étudiés.
- Évaluer les potentialités des couples symbiotiques et de tester leur pouvoir adaptatif aux différents environnements répondant ainsi aux objectifs du développement national et régional.



Références

Bibliographiques

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUE

Adem L., 1974. Etude du comportement des luzernes annuelles (écotypes locaux et populations étrangères) dans les régions de Sétif, Médéa, Tiaret et Alger. Mémoire Ing. INA.Alger. 95p.

BROOKER C., 2007. Le corps humain étude, structure et fonction. Ed. De Boeck Université.p 2-4

Brumont F., 2008. Prés et pâturages en Europe occidentale. Ed. Presses.Univ. Du Mirail.292p

Burns R.C., Hardy R.W.F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higherplants.*Mol. Biol. Biochem. Biophys.***21.** pp 1-189

Camille M., 1980. Fourrages. Ed. La maison rustique. Paris. 302p.

Chambenoit C., Laurent F., Machet J.M., Sceurer O., 2002. Fertilisation azotée de lapomme de terre : Guide pratique. Ed. RNRA. 128p

Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. and Li, Y., (1995)-Characteristics of *Rhizobium trianshanense* sp. Nov. Moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int. J.Syst.Bacteriol.* 45(1), 153-159.

Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT (2006) Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 99-103.

Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. Quae. Paris. 383p

Delalande M, Greene S, Hughes S, Nair R, Huguet T, Aouani ME, Prospero JM (2007) Wild accessions / populations. *Medicago truncatula* handbook 1-27

Derek Munro B, Ernest S (1997) Les légumes du Canada. NRC Research Press, AmazonFrance.

Duc G., Mignolet C., Carrouée B., Huyghe C. (2010). Importance économique passée et présentes de légumineuses: Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Inn.Agro.***11.** 24p.

FOURY A., 1954. Les légumineuses fourragères au Maroc, RABAT (service de la recherche agronomique)

Génier G. Guy P., Prosperi J.M., 1992. Les luzernes. In: Gallais A et Bannerot H (Eds): amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. Ed. Quae. 768p.

GHEDIRI O., 2007. Effet de stress hydrique sur quelques paramètres phénologiques de la luzerne (*Medicago sativa* L.) mémoire d'ING en biologie, UKMO

Guignard JL, Dupont F (2005) Botanique. 13^{ème} Edition Masson, Paris. pp. 336

Hireche Y (2006) Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L.) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère, Batna

Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Ed. de Boeck université. Paris. 514p.

Huhevet J., Keiter E.A., Keiter R., 1996. Chimie inorganique. Ed. De Boeck université. Paris. 1072p.

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE DU MAROC, 1965. Les cultures fourragères irriguées au Maroc, INRAA, Rabat, p 28

La pevronie A., 1982. Les productions fourragères méditerranéennes. Eds. Maisonneuve

Lengeter J.W., Drews G., Schlegel H.G., 1999. Biology of the Prokaryotes. ED. Georg Thieme Verlag. 955p

LESINS K. A., LESINS I., 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. Plantecology. Boston, London Vol 50. N° 2: P 228- 229.

Luttge G., Pienaar B.J., Braune K, Perrino P., 1994. Collecting with Vigna in Natal and Transvaal (South Africa). Plant Genetic Resources Newsletter. pp. 21-23

Madigan M et Martinko, 2007. Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris. 1047p

Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C., 2009. Environmental microbiology. Ed. Academic Press. 598p

- Mathieu M (2003)** Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. *France agricole* 11-16
- Mauries M., 2003.** Luzerne : culture, récolte, conservation, utilisation. Ed. France Agricole. Paris. 240p
- MESSIOUGH A., 2016.** Etude d'une plante fourragère la luzerne *Médicagosativa. L* : importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques. Thèse de doctorat. UBMA (université badjimokhtar Annaba). P 314
- Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (1992)** Statistiques agricoles. Série B
- Munro D. B, et Small E., 1997.** Les légumes du Canada. Ed. NRC Research Press. 436p.
- Pelmont J., 2005.** Biodégradations et métabolismes : les bactérie pour les technologie del'environnement. Ed. EDP Science. 798p
- Perry J.J., staley J.J., Lory S., 2004.** Microbiologie : Cours et questions de révision. Ed. Dunod. Paris. 891p
- Pousset J., 2002.** Engrais vert et fertilité des sols. Ed. France. Agricole. Paris. 303p.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2003.** Microbiologie. Ed. De Boeck université. 1137p.
- Prosperi JM, Isabelle O, Angevain M, Génier G, Nansat P (1993)** Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes INRA. Mauguio. N°4: 1-5.
- Pujic P; Normand P., 2009:** La symbiose racinaires entre la bactérie *Francia* et les plantes acinorhizobiennes . Biofature 298 pp 26-29
- Quézel P, Santa S (1962)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Paris
- Raven PH, Evert RF, Eichlorn SE (2000)** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris

Référence électronique 1 : Tela Botanica, 2012. <http://www.tela-botanica.org/site:accueil>

Référence électronique 2: APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161 : 105–121.

Référence électronique 3 : Agence canadienne d'inspection des aliments. La biologie du *Medicago sativa* L. (luzerne) Végétaux <http://www.inspection.gc.ca/vegetaux/vegetaux-caracteres-nouveaux/demandeurs/directive-94-08/documents-sur-labiologie/medicago-sativa-1-/fra/1330981151254/1330981232360>

Référence électronique 5 : Chiders W-R., 2008. Luzerne. Encyclopédie Canadienne. Canada. 2p. (<http://www.thecanadanencyclopedia.com/index.cfm>).

Ricklefs et Miller, 2005. Ecologie. Ed. De Boeck université. Paris. 858p.

Rose M.R. et Mueller L.D., 2006. Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. 693p.

SICA-FRANCE MAÏS., 1990. Luzerne : conduite et diagnostic; Les cahiers techniques de France Maïs, Ed. Sica-France Maïs S.A., Toulouse, p 28.

Sprent J.I., 1995. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. Soil Biol. Biochem 27: 401-407.

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., 2003. Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau Pédagogique Inc. 945p.

TOUTAIN G., 1979. Elément d'agronomie saharienne : de la recherche au développement. Ed. Imp. Jouve. Paris. 276.

Vilain M., 1997. La production végétale : les composantes de la production. Ed. TEC et DOC. 478p.

Wekeford T., 2004. Aux origines de la vie : Quand L'homme et le microbe s'approprient. Ed. De Boeck université. Paris. 128p.

Zakhia , F ., Jeder ,H., Domergue, O., Willems , A., Clayey –Marel,J. –C ., Gillis,M., (2004)

MATERIELS ET METHODES

Chabbert, Y.A. (1972): Les antibiotiques en bactériologie médicale. Flammarion, Paris.

Jordan D.C., 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wilkins Co. Baltimore. p.234 - 254.

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York. Inc. pp 450.

Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

RESULTATS ET DISCUSSION

Abramovitch R.B. and Martin G.B. (2004): Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defences. *Curr. Opin. Plant Biol.* pp. 7: 356-364

Allen E. k. and Allen O. N. (1950): Biochemical and symbiotic properties and symbiotic properties of the Rhizobia. *Bact. Rev.* pp. 14; 273-330

Appunu .C., Dhar .B., 2006: Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5(10) pp 842-845

Beck, D .P., Materon, L .A ., et Afandi, F . (1993) Pratical Rhizobium-legume

Bekki, A. (1986) fixation d'azote en condition de stress salin chez *Medicago* : sensibilité respective des partenaires symbiotiques .Thèse de Doctorat, Université des sciences et techniques de Nice, 80.

Bensaid, K. (2002). Caractérisation phénotypique des rhizobia isolés de *Medicago polymorpha* de la région de Bejaia et étude de l'effet de NaCl sur leur symbiose. Mémoire de Magister en Biologie. Université Abderahmane Mira Béjaia. 67p

Bertrand, H.(1997) Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan . thèse de doctorat Es- sciences, Université de Claude Bernard .Lyon I : 99p.

Brigido,C.,Alexander,A.,Laranjo , M.et oliveira, S. (2007) Moderately

Cepeda- Hernandez, M.L. (2005). Phenotypic characterization of rhizobia that nodulate ball clover. Thèse de Magister. Texas A ET M University. 61p. Conditions and in arid climate. *Microbiol. Molec. Rev.* 63(4), 968-989.

Chakraborty. U and. Chakraborty. B. N (2006): Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani f.sp. pisi* on pea affecting disease development and phytoalexin production. PP. 120-123

Cloonan , M..J. (1963) Black nodules in *Dolichos* .*Australian Journal Sci.*, 26: 121.

Crosaz, Y ., Dinger, F, (1999). Mesure de l'érosion sur ravines élémentaires et essais et végétalisation. Bassin versant expérimental de Draix. Les bassins versants expérimentaux de draix laboratoire d'étude de l'érosion en montagne-actent du séminaire , draix le Brusquet Digne , 22-24 OCTOBRE 1997.P.103-118.

Dart , P . J . (1977) infection and development of leguminous nodules. In *A treatise on dinitro – gen fixation*,section3,hady K.W.S (de) John Willey and sons, New York, 367-472.

De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewetting D., Maestrojuan G., Neyra M., CollinsM.D., Dreyfus B., Kesters K., and Gills M , 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia:Emendation of the genus *Sinorhizobium*and description of *Sinorhizobiummeliloti*comb.Nov., *Sinorhizobiumsahelisp.* Nov., and *Sinorhizobiumteranga sp.* Nov. *Int. J. Syst.Bacteriol.* 44 :715 - 733.

Diez,B., Fajardo,S., Puertas-Mejia,M .A.,del Rosario de Felipe, M. et Fernandez Pascual, M. 2009 : Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of rootnodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol.*191, p 35-46.

Dobereiner , J. (1965) Black nodules on *Centrosoma pubescens* ; *Soil: Biol . Intern . News Bul.* N° 2.

Dommergues Y et Mangenot F., 1970. Ecologie microbienne du sol. Eds. Masson et Cie.Paris. 796p.

El-Hilali I., 2006 : La symbiose *Rhizobium*-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinusluteeus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

Graham P. H. (1964a):The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol. pp. 35; 511-517.

Graham P. H. (1964b):Studies on the utilisation of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. Antonie van Leewenhoek J. Microbiol. Serol. pp. 30; 68-72.

Gray, E.J., Smith, D.L. (2005)Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant- bacterium signaling processes . Soil Biol Biochem 37, 395-410.

Jagdish K L. and Rolando B SO (1994)Numerical Taxonomy of photosynthetic rhizobial nodulating *Aeschynomene* Species. International journal of systematic bacteriology 44 (1): 62-73.

Jordan D.C., 1984. Family III.*Rhizobiaceae*Conn 1938. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.).Bergey' s manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams &Wlikins Co. Baltimore. p.234 - 254.

Kedjar, F. (2001). Caractérisation phenotypique et analyse des protéines en SDS/PAGE de souches de *Rhizobium meliloti* isolées de la région de Bejaia. Thèse de Magister. Université Abderahmane Mira. Béjaia. 82p.

LipsanenP., et Lindstr m k., (1989): Lipopolysaccharides and protein patterns of *Rhizobium* sp.(Galega).FEMS Microbiol .Lett.58,pp323-328.

Mahdhi M ,Nzoue A., de Lajudie P, et al . (2008)characterization of root nodulating bacteria on *retama raetam* in arid Tunisian soils .prog. Nat . Sci ., 18:43-9

Mahdhi M ,Nzoue A.,Gueye , F. et al. (2007) Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae* microsymbionts from the infra-arid region of Tunisia . Lett. Appl. Microbial., 45:604-9

Missbah El Idrissi M., Auajjar N., Belabed A., Dessaux Y., et Filali-Maltouf A., 1996 : Characterization of rhizobia isolated from carob tree (*Ceratonia siliqua*). J. Appl. Bacteriol. 80, pp165-173.

Moawad, H., et Beck D., 1991 : Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field –grown lentil. Soil Biol. Biochem. 23, pp917-925.

Nutman, P.S (1956) The influence of the legume in root-nodule symbiosis. Biol. rev.

Priefer, U.B., Aurage J., Boesten, B., Bouhmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., 2001 ; Productivity and role of symbiotic nitrogen fixation, in cropping système. In Serraj R. Symbiose nitrogenfixation, prospects for enhanced application in tropical agriculture. Oxford and IBH publishing. New Delhi 67- 97.

Pagano, M.C., (2008): Rhizobia associated with neotropical tree *Centropogon tomentosum*.

Rae D.L.N., Giller K.F., Yea A.R., Flower T.J., 2002: The affects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). Annals of Botany. 89, pp563-570.

Raza S., Jürnsgard B., Abou-Taleb H., and Christiansen J. L., (2001) Tolerance of *Bradyrhizobium sp. (Lupini)* strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics Letters in Applied Microbiology. pp. 32; 379-383

Räzänen L.A., 2002: Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

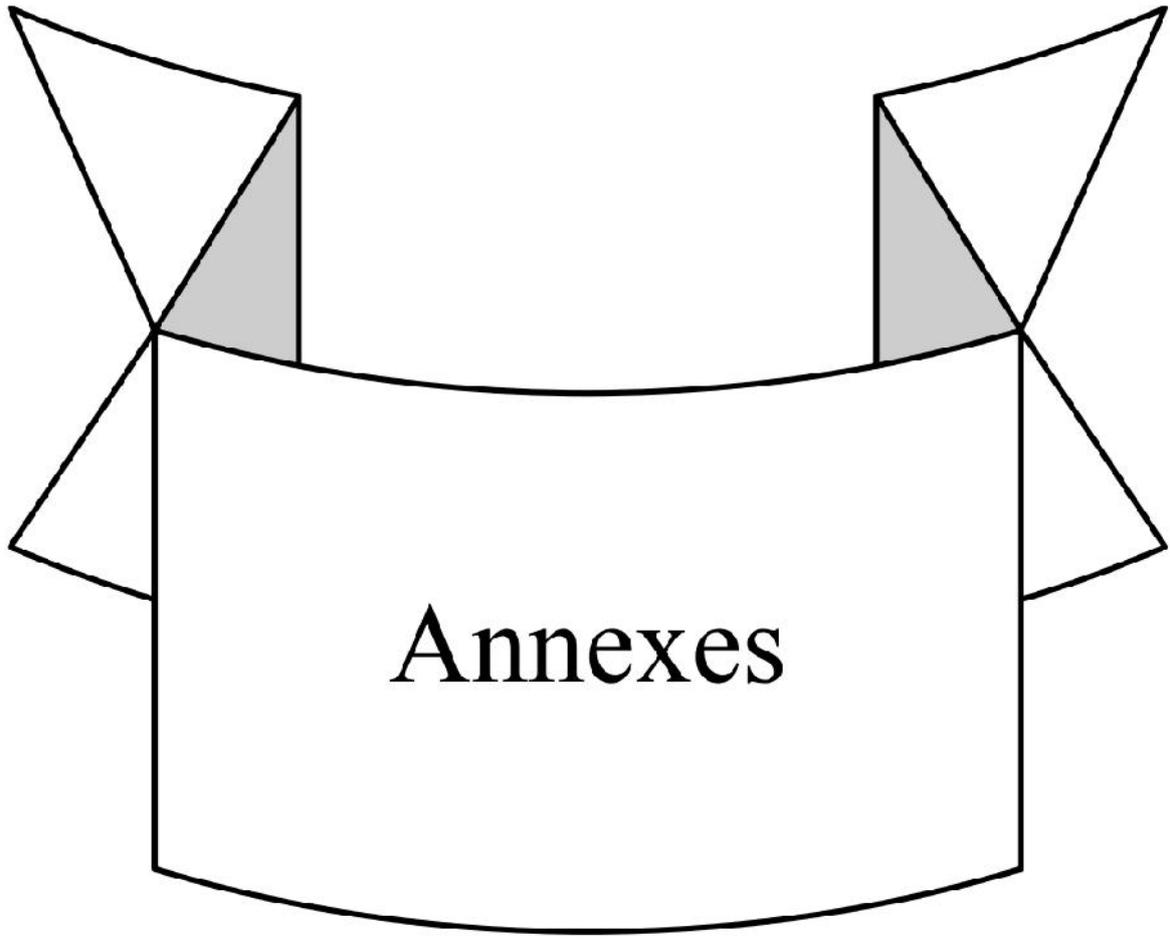
Roughley, R.J., Wahab, F.A., et Sundram, J. (1992) intrinsic resistance to.

Rosenberger C. M., Gallo R. L., and Finlay B. B. (2004): Interplay between antibacterial effectors: A macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication; PNAS, vol. 101 no. 8 2422-2427

Serraj, R., Adu-gyamfi J., Drevon J. et al., (2004) improvement of legume.

Saadallah K., Drevon J.-J., Abdelly C., 2001 : Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21, pp 627-634.

- Shishido M. and PEPPER I. L. (1990):** Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol Bioch* 22 (1):11-16.
- Stanier R. Y., Adelberg E. A. and Ingraham J. (1976):** *The Microbial World*, pp 65 and 82. Prentice. Hall, New Jersey.
- Stowers, M.D. (1985).** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39,89-108.
- Tao, H., Brewin, N. J., et Noel, K. D. (1992)***Rhizobium leguminosarum* CFNH2. Lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. *Bacteriol.*, 174:2222-2229.
- Upchurch, R.G., etElkan, G.H.(1977)**comparison of colony morphology,salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum* . *Can. J. Microbiol.*, 23:1118_1122.
- Vincent, J.M. 1970.** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.IBPHandbook No15. BlackwellScientificPublishers, Oxford.
- Vessey, J.K., Chemining, G.N., 2006:**The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarium*bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry* 38.
- Zahran, H., Karsitil, A. M., et Lindstrom, k. (1994)** Alternation of Lipopolysaccharides and protien profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *Word j.Microbiol .Biotech.*, 10:100-105.
- Zahran H.H., 1999 :***Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63,pp 968–989.
- Zakhia , F ., Jeder ,H., Domergue, O.,Willems , A., Cleyet –Marel,J. –C .,Gillis,M., (2004)**
- Zribi, K.,Mhamdi , R.,Huguet ,T., et al .(2004)** Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural poplations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils .*Soil. Boil .Biochem.*, 36: 903-8
- Xu ,L.M., Ge,C., Cui , Z., Li , J., et Fan , H .(2005)***Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int . Syst. Bacteriol .*,45(4):706-711.



Annexes

Annexe01

Composition du Milieu de culture YEMA et YEMB (Vincent, 1970)

Extrait de levure1g
 Agar-Agar15g
 Mannitol10g
 Solution minérale de Bergersen 10 M.....100ml :
 CaCl₂, 2H₂O 0.53g
 KCl 1g
 FeCl₃ 0.02g
 Na₂HPO₄, 12H₂O 4.5g
 MgSO₄, 7H₂O 1g
 H₂O distillée 1000ml
 H₂O distillée.....qsp 1000ml
 PH (6.9 –7)

Composition du Milieu de culture YEMA (Vincent, 1970)

La même composition sans l'ajoute d l'agar

Annexe 02

Coloration de Gram :

- 1_ On dépose une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2_ On prélève un échantillon de colonie à l'aide d'une anse
- 3_ On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- 4_ La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 1 minutes (en fonction de la concentration); Rincer à l'eau distillée
- 5_ Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 30 secondes ; Rincer à l'eau distillée.
- 6_ Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau distillée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- 7_ Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 sec . Laver doucement à l'eau distillée, et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant

8_Deposer une goutte d'huile d'immersion sur le frottis et observe au microscope a un fort grossissement ;Les cellule gram positif absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence , contrairementLes bactéries Gram- sont colorées en rose.

Annexe 03

Composition de milieu YEMA+bleu de bromothymol en g /l

YEM.....1000ml

Solution stock de bleu de bromothymol.....5ml

pH.....6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0,5 g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Annexe 04

Solution nutritive de culture des plantes (Bertrand, 1997)

éléments	Poids moleculaire	Solution finale	Solution mère g/l	Ml de solution mère/l de sol.finale
Macro-éléments			mM	
KI ₂ PO ₄	136,09	0,1	13,609	1
KCl	74,55	3	223,65	1
CaCl ₂ , 2(H ₂ O)	147,02	2	249,04	1
MgSO ₄ , 7(H ₂ O)	246,48	1	246,48	1
Micro-éléments			µM	
I ₃ BO ₃	61,8	4	6, 25	0,04
MnSO ₄ , H ₂ O	169	6	25	
ZnSO ₄ , 7 (H ₂ O)	287,54	0,9	6, 25	
CuSO ₄ , 5(H ₂ O)	249,68	1	6, 25	
Na ₂ MoO ₄ , 2(H ₂ O)	241,95	0,1	0, 625	
Sequestrène de fer			16,6	
KNO ₃	101,1	0,5	100	0,5
Ca(NO ₃) ₂	164,09	0,5	82	1

