



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE ou INSTITUT : DES SCIENCES ET DE L'INGENIORAT

DEPARTEMENT : D'AGRONOMIE

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : RENANE Zohra

DOMAINE : Science de nature et de la vie

FILIERE : Sciences agronomiques

OPTION : Protection des végétaux et de l'environnement

Thème

Isolement et caractérisation des bactéries du genre *Rhizobium* à partir de la luzerne et la mise en évidence de l'activité antifongique.

Jury de soutenance :

M^{me} TOUATI Siham

MAA

Présidente

M^{elle} ZAZA Messouda

MAA

Examinatrice 1

M^{elle} AMUR Djemila

MAA

Reportrice

Promotion : juin - 2015

Sommaire

Titre	Page
Résumé	I
Dédicace	II
Remerciements	III
Liste des tableaux	IV
Listes des figures	V
Liste des abréviations	VI
Etude bibliographique	
Introduction	1
I. Les légumineuses	3
I.1. Les <i>Papilionoideae</i>	3
I.2. Les <i>Mimosoideae</i>	3
I.3. Les <i>Caesalpinoideae</i>	4
I.4. Intérêts des légumineuses	4
II. <i>Le Rhizobium</i>	4
II.1. Caractères morphologiques	4
II.2. Caractères biochimiques	6
II.3. Caractères physiologiques	6
II.4. Caractères culturaux	7
II.5. Classification des <i>Rhizobia</i>	7
III. La relation <i>Rhizobium</i> – légumineuse	9
III.1. Infection et nodulation	9
III.2. Le Processus de fixation de N₂ atmosphérique	12
III.3. Le complexe nitrogénase	12
III.4. Rôle de la leghémoglobine	13
IV. La fixation symbiotique de l'azote	14
IV.1. Rôle de la fixation biologique dans le cycle de l'azote	14
IV.2. les facteurs influençant la fixation biologique de l'azote	16
V. La contribution des rhizobiums dans la lutte biologique	16
V.1. Mécanismes d'antagonisme chez les rhizobiums	17
V.1.1. L'antibiose	17
V.1.2. Hydrolase	17
V.1.3. La compétition	17
V.1.3.1. Sidérophores et compétition	18
VI. Inhibition des champignons phytopathogène	18

VI.1. les sidérophores	18
VI.2. Rhizobactine des <i>Rhizobium</i>	19
VII. L'induction de la résistance systémique	19
Matériels et méthodes	
I. Matériel biologique	21
I.1. Matériel végétal	21
I.2. Matériel mycologique	21
II. Méthode de travail	22
II.1. le choix des nodules	22
II.2. Isolement des bactéries à partir des nodules	22
II.3. La validité de la désinfection superficielle	23
II.4. Identification phénotypique des isolats	23
II.4.1. Test de Gram	23
II.4.1.a. Test de KOH	23
II.4.1.b. Coloration de Gram	24
III. Caractérisation physiologiques et culturaux des isolats	25
III.1. La croissance des isolats sur différents milieux de culture	25
III.2. Effet de la température	25
III.3. Effet du pH	26
III.4. Tolérance à la salinité	26
IV. Caractérisation biochimique des isolats	26
IV.1. Test de l'activité oxydase	26
IV.2. Les galeries API 20 NE	27
IV.1.1. la préparation des suspensions	27
V. Essai de l'antagonisme <i>in vitro</i>	30
Résultats et discussions	
I.1. Isolement des bactéries	32
I. 2. La validité de la désinfection superficielle	33
I.3. Caractères morphologiques des isolats bactériens	34
I.3.1. Test de Gram	34
I.3.1.a. Test KOH	34
I.3.1.b. Coloration de Gram	34
I.4. Caractéristiques culturaux des isolats	36
I.5. Caractérisation physiologique	39

I.5.1. Effet du pH	39
I.5.2. Effet de la température	39
I.5.3. Effet de la salinité	40
II. Caractéristique biochimiques des isolats bactériens	41
III. Essai de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	43
IV. Discussion	44
Conclusion	52
Références bibliographiques	54
Annexe	65

Renane Zohra

Titre : Isolement et caractérisation des bactéries du genre *Rhizobium* à partir de la luzerne et la mise en évidence de l'activité antifongique.

Résumé

Un totale de 10 bactéries a été isolée partir des nodules de la luzerne cultivée *Medicago sativa*.L récoltés de trois régions de la wilaya de Laghouat.

L'objectif de notre travail est basé sur l'isolement et l'identification préliminaire des bactéries rhizobiale à partir des nodules de la luzerne.

Après la purification des isolats obtenus nous avons opté pour une caractérisation morphologique basée sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies ainsi qu'une révélation de la forme microscopique par le test de Gram.

Le comportement des isolats bactériens cultivés sur différents milieux de culture à été testé.

Une caractérisation physiologique a fait partie de notre étude , notamment l'effet de différents degrés de pH et l'influence de différentes température sur la croissance des bactéries ainsi que la tolérance des isolats vis à vis de différents type de sels .

Une étude biochimique des isolats bactériens a eu lieu à partir le de l'activité oxydase, et des tests conventionnelles et d'assimilation sous forme déshydraté réunis dans une galerie API 20 NE, en plus de l'étude de l'effet inhibiteur de ces isolats sur la croissance de trois champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium*.

Les résultats des différents tests réalisé nous ont permis de nominer les isolats : La8, La6', La6, et La8/7 comme des isolats susceptible à appartenir au genre *Rhizobium*.

Les souches La8, La6', et La6 ont présenté une inhibition de la croissance des champignons testés du genre *Fusarium*, les meilleurs résultats ont été enregistrés vis-à-vis du champignon *F. oxysporum* F. sp. *lycopercisi* avec des taux de croissance respectivement de 70%,66.77%, et.68.33%

Mots clés : Caractérisation, identification, nodule, luzerne, *Rhizobium*, activité anti fongique

Renane Zohra

Title: isolation and characterization of bacterial Rhizobia obtained from alfa alfa nodule and highlighting the antifungal activity

Abstract:

A total of 10 bacteria were isolated from nodules of alfalfa *Medicago sativa*.L harvested from three regions of Laghouat city.

The objective of our work is based on the isolation and preliminary identification of rhizobial bacteria from nodules of alfalfa.

After purification of the isolates obtained we opted to a morphological characterization based on the macroscopic observation of the appearance of the colonies and a revelation of the microscopic shape by the Gram test.

The behavior of bacterial isolates grown in different culture medium was tested.

Physiological characterization is part of our study, including the effect of different degree of pH and the influence of different temperatures on the growth of bacteria as well as the tolerance of different isolates against different types of salts.

A biochemical study of bacterial isolates was held from the oxidase activity, and conventional tests and assimilation in dehydrated form together in a gallery API 20 NE, in addition to the study of the inhibitory effect of these isolates on the growth of three phytopathogenic fungi belonging to the genus *Fusarium*.

The results of various tests carried out allowed us to nominate isolates: la8, la6, la6' and la8 / 7 as probable isolates belong to the genus *Rhizobium*.

The la8 strains la6 and la6' showed an inhibition of the growth of fungi tested, the best result was recorded against the FOP fungus with growth rate of 70%, respectively, 66.77% and 68.33%.

Keywords: characterization, identification, nodule, alfalfa, *Rhizobium*, anti fungal activity.

الزهراء رنان

: عزل و تصنيف بكتيريا ريزوبيوم من عقد جذور و تسليط الضوء على النشاط المضاد للفطريات.

:

10 بكتيريات من عقد نبات الفصاة المزروعة و المتحصل عليها من ثلاث مناطق من ولاية الاغواط .

هدف العمل يرتكز على تحديد لبكتيريا ريزوبيوم المعزولة من عقد الفصاة .

بعد عملية تطهير العزلات البكتيرية قمنا بعملية تصنيف مورفولوجي على كروسكوبية و بنيتها عن طريق اختبار Gram

والذي يتمثل في نموها و تغييره .

قمنا بعملية تصنيف فيزيولوجي للعزلات التي تركز على قدرة هذه الأخيرة بتركيبة مختلفة ال قدرة هاته العزلات على تحمل عدة درجات من الحموضة و دراسة تأثير

دراسة بيوكيميائية أجريت قدرتها على الأكسجين و ذلك لتبيين قدرتها على استعمال عدة مصادر من الكربون و وجود بعض الإنزيمات فطريات مسببة *Fusarium*

النتائج المتحصل عليها عن طريق مجموع الاختبارات المحققة مكنتنا من ترشيح العزلات La8, La6 La6', La7/8

Rhizobium

La8, La6, La6' بالتأثير الفطريات الثلاث أهم النتائج المتحصل عليها سجلت ضد

68.33 % , 68.77% , 70% *Fusarium oxysporum* F sp *lycopersici*

بالترتيب على ضوء هذه النتائج متابعة عملية التحديد للعزلات المتحصل عليها و ذلك عن طريق اختبارات أكثر تطورا و دقة خاصة التحديد الوراثي بالإضافة إلى دراسة تأثيرها على فطريات و بكتيريا أخرى مسببة لأمراض النبات

الكلمات المفتاحية : تصنيف, تحديد , , ضد الفطريات, *Rhizobium*

DÉDICACE

A dieu le tout puissant

A tous ceux qui sont mort pour que vive l'Algérie

A la reine des terres PALESTINE

A mes parents

A mes sœurs Nour el Houda Amina et aicha vous êtes le secret de mon sourire dans cette vie

A mon encadreur et enseignante Melle AMUR DJEMILA que dieu vous protège et vous donnera la place que vous mérité dans ce monde et dans le paradis sans vous je n'aurais ni la chance ni l'espoir d'achever mes études et de rencontré des gens aussi agréables que vous

A la mémoire de ma grande mère hadja ZOHRA BEDERINA les jours passe et mon amour pour vous ne cesse de grandir vous me manquer chère mère

A ma chère grande mère hadja KHDIDJA BAADJ

A ma promotion d'ingénieur

A ma promotion de master 2 : HASSINA, KHADIDJA, ZAHIA, SABRINA, AICHA, KELTOUM, YACINE CHOUIHA, SLIMANE, ADEL, BEN ALIA ET MEHDI j'ai eu un plaisir de vos connaitre.

A tout les agréables gents que j'ai eu la chance de rencontré cette année surtout ma chère AMINA LAKHDARI, et NAIMA RAMOUL

A Mon ami et collègue de laboratoire OUADAHI ISLAM

Aux très chères frères et sœurs, SOUMIA, RAYANE, HAMID, CHOAIIB, SARAH, M'BARKA, FERIELL, ISAMIL, HALIMA, AHLEM, LEILA et KARIMA.

Sans oublier IMANE, SABRINA, SANA, AMINA ET MAROUA

A vous tous je dédie ce travail

Zohra ☺

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

La première personne que je tiens à remercier est mon encadrant et enseignante M^{me}. AMUR DJAMILA pour l'orientation, la confiance, et la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

J'exprime ma profonde reconnaissance à tous les membres du Jury Mme TOUATI. S et Melle ZAZA.M qui sont aussi nos enseignantes.

Je tiens à saisir cette occasion et adresser mes sincères remerciements aux corps professoral de département d'agronomie pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée sans oublier l'équipe de laboratoire du département d'agronomie et de biologie pour leurs aident et leur serviabilité.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

List des tableaux

Tableau 1. Classification des rhizobiums

Tableau 2. Table de lecture de la galerie API 20 NE

Tableau 3. Les caractéristiques morphologiques des isolats observé sous microscope optique à l'objectif 100

Tableau 4. Caractères morphologiques des isolats observé a l'œil nu

Tableau 5. Le comportement des isolats bactériens sur différent milieu de culture.

Tableau 6. La croissance des isolats à différents degré de pH

Tableau 7. La croissance des isolats bactériens sous l'influence de différentes températures

Tableau 8. Effet de la salinité sur la croissance des isolats bactériens

Tableau 9. Résultats des tests biochimiques effectués à l'aide de la galerie API 20 NE

List des figures

- Figure 1.** Bactéries rhizobiales libres vu sous microscope électronique
- Figure 2.** Bactéroïdes à l'intérieure de la cellule végétale
- Figure 3.** Les étapes de la formation de nodule chez les légumineuses
- Figure 4.** Leghamoglobine dans les cellules de nodosités des légumineuses.
- Figure 5.** Le cycle de l'azote
- Figure 6.** Aspect macroscopique du champignon *Fusarium pseudograminirum*
- Figure 7.** Réaction positive du test KHO 3%
- Figure 8.** Méthode de préparation de la suspension d'inoculation de la galerie API NE 20
- Figure 9.** Essai de l'antagonisme des isolats bactériens
- Figure 10.** Bactéries issues des deux techniques d'ensemencements ; A à partir des fragments de nodules ; B à partir de la solution du broya.
- Figure 11.** Isolat bactérien pure.
- Figure 12.** Nodule de luzerne désinfecté superficiellement après incubation
- Figure 13.** Le comportement des isolats bactérien sur les différents milieux de culture A ; B ; C ; D. A : milieu YMA+ BTB ;B : milieu YMA+BCP ; C : milieu GPA ; D : milieu YMA+ RC.
- Figure 14.** Résultats de l'activité antifongique de la souche La6 en confrontation directe avec le champignon *Fusarium oxysporum* F. sp. *Albedinis*.
- Figure 15.** Taux d'inhibition des isolats bactériens sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* F. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopercisi*, et *Fusarium pseudograminearum*.

List des abréviations

Abbreviation	Développement
°C	Degré Celsius
µl	micro Litre
ADH ₂	L-arginine
ADI	Acide adipique
ANOVA	Analysis of variance
API	Analytical Profile Index
ARA	L-arabinose
ARA	Arabinose
BCP	Pourpre de Bromocresol
BTB	Bleu de Bromothymol
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CAP	Acide caprique
CIT	Trisodium citrate
cM	Centimeter
ESC	Esculine
FOA	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>
FOL	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
FP	<i>Fusarium pseudograminearum</i>
G-	Gram négative
g/l	Gram par Litre
G+	Gram positive
GEL	Gelatine
GLU ₂	D-glucose
GLU	D-glucose
GLU	Glucose
GNT	Potassium gluconate
GPA	Glucose-Peptone-Agar
I	Taux d'inhibition
K ₂ SO ₄	Sulfate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
LPS	Lipopolysaccharides

MAL	D-maltose
MAN	D-mannitol
MLT	Acide malique
mM	Millimètre
MNE	D-mannose
NaCl	Chlorure de sodium
NAG	N-acetyl-glucosamine
NO₃	Nitrate de potassium
PAC	Acide phénylacétique
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
pH	Potentiel d'hydrogène
PNPG	4-nitrophényl- D-galactopyranoside
R	<i>Rhizobium</i>
RC	Rouge Congo
TRP	L-tryptophane
URE	Urée
YMA	Yeast Extract Mannitol Agar
mL	Millilitre

- **Introduction**

L'azote est reconnu autant qu'un élément majeur indispensable à la croissance et le développement des végétaux. En effet il représente un facteur limitant pour la croissance de ces plantes, car il fait partie des constituants essentiels des protéines, des acides aminés, des acides nucléiques, et de la chlorophylle, la plante peut se bénéficier de l'azote provenant de deux sources ; le premier est les résultats de la minéralisation de la matière organiques dans le sol, et le deuxième par des apports d'engrais minéraux ou bien organique aux cultures. En fait et à mesure que les besoins alimentaires augmentent l'extension des superficies agricoles augmente ce qui implique l'augmentation de l'utilisation des engrais azotés. Malgré l'effet bénéfique qu'exerce l'apport d'engrais azoté sur le rendement et la qualité de la production agricole son effet spectaculaire sur la régénération de la fertilité des sols a été rapporté par plusieurs travaux. Ce dernier peut causer de sérieux dégâts environnementaux en cas d'une mauvaise gestion ou s'il n'est pas assimilé par la plante au moment idéal (Ziadi *et al.*, 2007).

Thibadou *et al.*, (2006) ont rapportés que l'efficacité des engrais azotés est de l'ordre de 45% seulement de la quantité totale employée, la partie non absorbée par la plante peut subir des transformations et être, soit immobilisée, soit perdue par volatilisation, dénitrification, ou lessivage.

Cette partie non utilisée de l'azote représente un effet néfaste sur l'environnement et sur l'homme, la recherche de solution qui peut satisfaire les deux cas peut être assurée par la culture des légumineuses qui peuvent fixer l'azote grâce à des relations symbiotiques effectuées grâce aux bactéries rhizobiales qui se trouvent au niveau des racines de ces dernières sous formes de nodosités (Chitra, 2013).

La transformation de l'azote atmosphérique par des microorganismes du sol en azote combiné assimilable par les plantes, peut constituer une alternative à l'utilisation des engrais chimiques azotés, ou du moins permettre de réduire leurs utilisations dans le système agricole. En plus de leurs effets bénéfiques dans la fixation de l'azote atmosphérique, les rhizobiums possèdent aussi un effet inhibiteur sur la croissance de certains champignons et bactéries phytopathogènes et cela par la sécrétion des antibiotiques et des sidérophores en plus de la compétition dans le sol sur les nutriments et sur l'espace, leur rôle dans l'induction de la résistance systémique chez les plantes a été aussi révélé,

leurs utilisation est donc large est peut être efficace pour la protection des végétaux et de l'environnement (Iakhal, 2012).

Certaines plantes comme les légumineuses, peuvent, cependant puiser et fixer l'azote gazeux présent dans l'atmosphère grâce à une association symbiotique avec des bactéries appelées rhizobies. Cette symbiose se traduit par la formation au niveau des racines des légumineuses de pré-tubérance appelée nodules ou nodosité dans laquelle ces plantes hébergent les rhizobies dans un environnement propice à l'activité fixatrice d'azote. (Sadowsky et Graham, 2006).

À l'égard de ces informations nous avons effectué cette étude qui repose sur l'isolement et la caractérisation des bactéries à partir des nodules de luzerne cultivée (*Medicago sativa*, L).

Les isolats obtenus ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique permettant de distinguer leurs aspects micro et macroscopique en plus du comportement des isolats sur différents milieux de cultures, l'effet des facteurs abiotiques sur la croissance et la résistance des isolats dans le milieu a fait partie de notre étude, une caractérisation biochimique et en fin l'activité inhibitrice exercée sur trois souches de champignon phytopathogène appartenant au genre *Fusarium* ont été étudiées.

I. Les légumineuses

Les légumineuses sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones. ce sont les sœurs des *Polygalaceae*, composant avec les familles des *Quillajaceae* et *Surianaceae*, les Fabales (Judd *et al.*, 2001). Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*), avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006). Les espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.*, 2001). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds, les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont, 2005). Elles sont extrêmement diversifiées, cependant elles présentent un point commun, leur fruit est une gousse (Caratini, 1984).

En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinoideae*) (Guignard et Dupont, 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000). Cependant il y a encore 40% des légumineuses qui n'ont jamais été examinées pour la nodulation (Sprent, 1999).

I.1. Les *Papilionoideae*

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont, 2005). La sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Elle est cosmopolite et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Labat *et al.*, 1996). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd *et al.*, 2001). Les papilionacées sont utilisées pour la production des graines alimentaires (Pois, Haricot...), pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage (Luzerne, Sainfoin, Trèfle...), le soja est utilisé sur une large échelle dans l'élevage industriel.

I.2. Les *Mimosoideae*

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.*, 2001).

I.3. Les *Caesalpinoideae*

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd *et al.*, 2001).

I.4. Intérêts des légumineuses

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001). Au total un champ de trèfle fixe entre 50 et 100 Kg d'azote par hectare et par an. Le Soja et le Lupin, connus pour leur richesse en protéines, apportent au sol plus de 300 et jusqu'à 500 kg d'azote par hectare et par an (Frontier *et al.*, 2004).

Cette fixation leur permet de produire en abondance des protéines végétales ce qui constitue une source très importante dans l'alimentation humaine et animale (Baudoin, 2001). Leurs graines sont des aliments d'excellente qualité car leur contenu en protéines est parmi les plus élevés de toutes les plantes destinées à l'alimentation. Cela représente le meilleur moyen de produire des protéines végétales dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. En effet leurs capacités à fixer l'azote rendent inutile l'utilisation d'engrais azotés dont la synthèse, le transport et l'épandage consomment des combustibles fossiles (2 tonnes de fuel pour une tonne d'ammoniac) et contribuent à l'effet de serre (Dénarié, 2000).

Leur utilisation joue également un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, elles apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Babo, 2002). Dans les systèmes de culture utilisant les rotations, l'azote fixé par les légumineuses peut être utilisé d'abord par elles-mêmes, puis par les cultures suivantes qui peuvent bénéficier indirectement par l'entremise des résidus qu'elles laissent (Baudoin, 2001). Enfin elles servent également de cultures de fourrages, d'engrais verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures et des parfums.

II. Le *Rhizobium*

II.1. Caractères morphologiques

Les rhizobiums sont des bactéries Gram négatifs, non sporulant, on distingue deux formes :

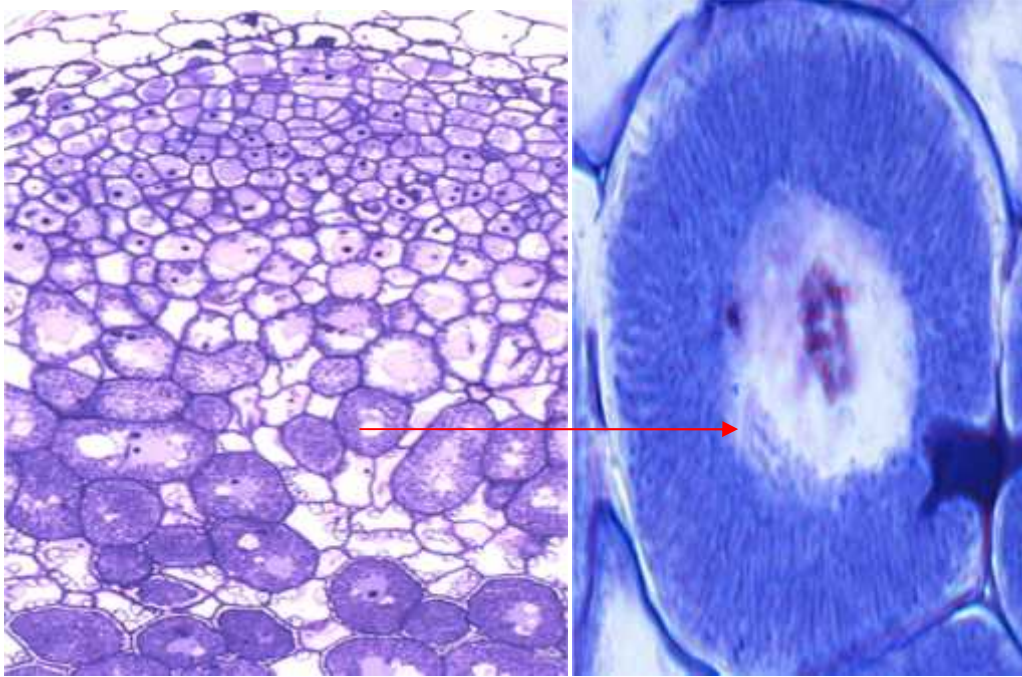
- La forme végétative : les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux (figure 1), à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 μm de largeur sur 1,2 à 3 μm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobiums à croissance rapide,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



Source : jmilu.com

Figure 1: Bactéries rhizobiales libres vu sous microscope électronique

- La forme bactéroïde : à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes (figure 2), de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et *al.*, 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).



Source: isv. cnrs-gif.fr

Figure 2 : bactéroïdes à l'intérieure de la cellule végétale.

II.2. Caractères biochimiques

Les rhizobiums sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose. (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums n'assimilent pas l'azote dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammonical ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

II.3. Caractères physiologiques

Le rhizobium est un micro-organisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un

milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

II.4. Caractères culturels

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

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobiums (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994). Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin et *al.*, 2006). (Grama, 2008).

II.5. Classification des *Rhizobia*

Pendant longtemps, les propriétés symbiotiques sont restées la seule base de caractérisation des rhizobia mais actuellement l'on a complété l'étude classique des caractères phénotypiques par celle de la structure génomique (Krishnan et Bennet, 2007).

Les recherches récentes indiquent que la diversité des rhizobia, comme celle de tous les autres micro-organismes, est extrême (Amarger, 2001).

La classification des rhizobia a subi de nombreuses modifications ces dernières années et les propositions de remaniements futurs seront nombreuses. Le tableau 1 tente simplement de refléter l'état des connaissances actuelles sur la taxonomie des rhizobia (D'après Robert, 1976, Jordan, 1984, Young, 1996, Bekwe et *al.* 1997, et Kucuk et *al.* 2006) ; mais celle-ci est très probablement appelée à être modifiée à l'avenir.

Tableau 1 : Classification des rhizobiums

Genre	Espèce /Plante hôte	Références
Allorhizobium	<i>undicola/ Neptunia natans</i>	Robert, 1976
Azorhizobium	<i>caulinodans (Sesbania rostrata)</i> <i>doebereinae (Sesbania rostrata)</i>	Robert, 1976
Bradyrhizobium	<i>japonicum (Glycine max)</i> <i>elkanii (Glycine max)</i> <i>betae (Betae vulgaris)</i> <i>Canariense (Betae vulgaris)</i> <i>iriomotense (Entada koshunensis)</i> <i>Jicamae (Pachyrhizus erosus)</i> <i>pachyrhizi(Pachyrhizus erosus)</i>	Jordan, 1984
Mesorhizobium	<i>Loti (Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus)</i> <i>huakuii (Astragalus sinicus)</i> <i>ciceri (Cicer arietinum)</i> <i>tianshanense (Glycyrrhiza pallidiflora)</i> <i>mediterraneum Cicer arietinum)</i> <i>plurifarium (Acacia, Chamaecrista)</i> <i>amorphae (Leucaena, Prosopis)</i> <i>chacoense (Amorpha fruticosa)</i> <i>sesptentrionale (Prosopis alba)</i> <i>temperatum (Astragalus adsurgens)</i> <i>albiziae (Albizia kalkora)</i> <i>caraganae (Caragana spp)</i> <i>tarimense</i> <i>gobiense</i> <i>alhagi (Alhagi sparsifolia)</i> <i>australicum (Biserrula pelecinus)</i>	bekwe et al. 1997
Rhizobium	<i>Leguminosarum</i> biovar <i>viciae (Pisum, viciae, Lens, Lathyrus)</i> biovar <i>trifolii (Trifolium pratense)</i> biovar <i>phaseoli (Phaseolus vulgaris)</i> <i>Galegea (Galega, Leucaena)</i> biovar <i>officinalis</i> biovar <i>orientalis</i> <i>tropici type IIA et IIB (Phaseolus,</i> <i>Medicago, Macroptilium)</i> <i>etli (Phaseolus vulgaris)</i> biovar <i>mimosae (Mimosa affinis)</i>	

	<i>giardinii Phaseolus vulgaris</i> <i>biovar phaseoli</i> <i>biovar giardinii</i> <i>hainanensis (Desmodium sinuatum Centrosema, etc.)</i> <i>huautlense (Sesbania herbacea)</i> <i>mongolense (Medicago ruthenica, Phaseolus)</i> <i>yanglingense (Medicago ruthenica, Phaseolus)</i> <i>larrymoorei (Ficus benjamina)</i> <i>indigoferae (Indigofera spp)</i> <i>sullae (Hedysarum)</i> <i>loessense (Astragalus, Lespedeza)</i> <i>cellulosilyticum (Populus alba)</i>	Young, 1996
Sinorhizobium	<i>meliloti (Medicago, Melilotus, Trigonella)</i> <i>fredii (Glycine, Vigna, Cajanus)</i> <i>saheli (Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena)</i> <i>xingianense (Glycine max)</i> <i>arboris (Acacia, Prosopis)</i> <i>kostiense (Acacia, Prosopis)</i>	Kucuk et al. 2006

III. La relation *Rhizobium* – légumineuse

Cette symbiose est une association entre un eucaryote (végétal supérieur) et un organisme procaryote (*Rhizobium*) grâce à laquelle les légumineuses deviennent autotrophes à l'azote atmosphérique (Martin et Mazliac, 1995). La vie à l'état libre ou saprophytique du rhizobium dans le sol peut évoluer soit en mutualisme (fixation de N₂) soit en parasitisme (non fixation de N₂). Cependant la fixation d'une quantité insuffisante d'azote peut être considérée par la plante comme parasitisme aussi. L'infection des légumineuses est programmée génétiquement mais la non fixation est due probablement à une mutation du gène codant pour la nitrogénase (Denison et Kiers, 2004).

III.1. Infection et nodulation

Les sites spécifiques de ces symbioses sont des nodosités qui sont des sortes de racines secondaires dans lesquelles l'azote se trouve concentré au minimum 5 fois par rapport aux autres parties de la plante. La formation des nodosités a lieu de la façon suivante :

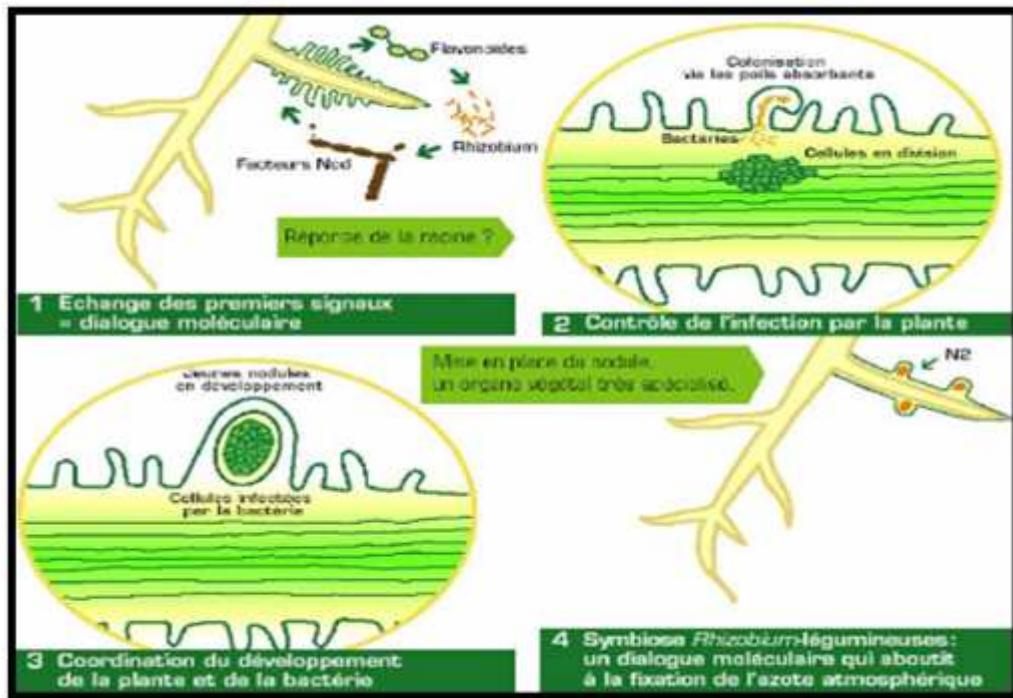
Les exsudats racinaires enrichissent la rhizosphère en acides aminés, sucres, flavonoïdes et biotine qui attirent par chimiotactisme les rhizobia (Figure 3).

Ces derniers sécrètent à leur tour les facteurs Nod (Lipo-chitin oligosaccharides) responsables de la déformation des poils absorbants en perturbant la croissance des cellules de la plante (Berwin, 2004) C'est une reconnaissance moléculaire qui s'établit entre la légumineuse et la plante hôte dont les lectines des poils absorbants seraient impliqués. Les bactéries forment un manchon autour de la racine et sécrètent des hormones comme l'acide Gibbérellique et l'acide indole acétique (La présence de tryptophane parmi les acides aminés contenus dans les excréments racinaires qui stimulent la multiplication du rhizobium autour des poils absorbants entraîne une activation de la synthèse hormonale de L'auxine) (Martin et Mazliac, 1995). En réponse, les poils absorbants de l'extrémité de la racine sécrètent la polygalacturonase, enzyme plastifiant les parois et permettant aux racines de former des crochets. Les poils fragilisés laissent entrer les rhizobiums en un cordon infectieux (formé de bactéries enrobées dans un mucilage) qui traverse l'épiderme jusqu'au cortex et atteint l'assise tétraploïde.

Le nodule se met en place grâce à l'activité méristématique du parenchyme cortical. Les rhizobia pénètrent alors ces cellules par endocytose puis croissent en taille d'un facteur d'environ quarante et prennent la forme de bactéroïde différenciant les chromatophores, dans lesquelles sont situés les nitrogénases (Lambers, 1998) (Figure 3).

Dans les cellules infectées les bactéroïdes ne sont pas en contact direct avec le cytosol mais isolés de celui-ci par une membrane du type plasmidique, d'origine végétale, appelée membrane pér bactéroidienne (MPB) qui est issue d'un phénomène d'endocytose impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cette vésicule peut contenir un ou plusieurs bactéroïdes et constitue une entité dénommée symbiosome. (Diworth, 2008).

Une fois formées, ces nodosités se présentent sous deux aspects dont l'activité méristématique continue amène à distinguer des nodosités du type indéterminé (digités ou coralloïdes) et des nodosités du type déterminé chez lesquelles le méristème a une durée d'activité limitée conduisant ainsi à des nodosités sphériques. Ces bactéroïdes perdent le pouvoir de se multiplier avant celui de réduire l'azote puis ils entrent en sénescence après plusieurs semaines. (Diworth, 2008).



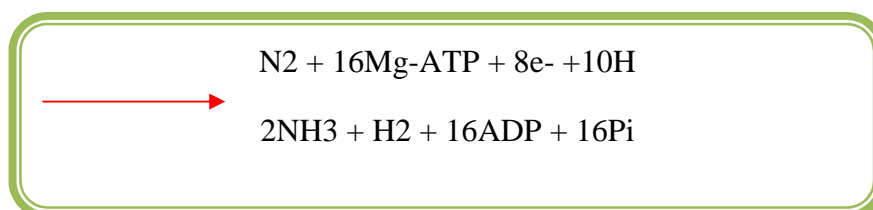
Source : Maougal, 2004

Figure 3 : les étapes de la formation de nodule chez les légumineuses

III.2. Le Processus de fixation de N₂ atmosphérique

Les rhizobia possèdent en commun un ensemble de gènes plasmidiques appelé sym (Ridecker, 1993). Cet ensemble comprend :

- Les gènes nod, indispensables à l'initiation des étapes préliminaires aboutissant à la formation du nodule
- Les gènes fix, nécessaires pour que le nodule fixe l'azote.
- Les gènes nif, codant pour un même système enzymatique complexe
- Le système nitrogénase responsable de la réduction de l'N₂ en NH₃ suivant la réaction endergonique globale suivante :



III.3. Le complexe nitrogénase

La nitrogénase est une enzyme qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines solubles du bactéroïdes. Elle est constituée de deux métalloprotéines de poids moléculaires différents :

- La protéine à molybdène-Fer appelée composant I
- La protéine à Fer, encore appelé composant II ou dinitrogénase réductase dont la réduction nécessite la présence d'un donneur d'électron à bas potentiel : La Ferredoxine.

Ces protéines dépendent fortement des conditions de pH et de température. Cet enzyme qui transfère au maximum 12 paires d'électrons par seconde et par molécule d'enzyme (3 molécules d'azote sont réduites par seconde) est peu actif. Pour remédier à cette défaillance les rhizobiums disposent d'une grande quantité de nitrogénase lui permettant de réduire suffisamment d'azote pour leur croissance (Rhijn, 1995).

Lors de la réduction, les électrons sont transférés de la protéine à Fer réduite, à la protéine MoFe. On admet que le substrat à réduire est inséré entre les atomes de Mo et que deux molécules d'ATP sont consommées par électron. Le diazote reste lié au cofacteur Fe-Mo-Co de la nitrogénase jusqu'à ce que tous les électrons et tous les protons aient été ajoutés. Ces électrons proviennent en grande partie du glucose et du saccharose produits de la photosynthèse. Notons que 40 à 70 % des électrons présents dans les nodules serviraient à la réduction d'azote et peuvent provenir de la lumière, de NADH, de H₂ ou du pyruvate mais principalement de la ferrédoxine réduite qui les transmet directement à la nitrogénase réductase tandis que le reste va servir à la formation de H₂ (Berwin, 2004).

Le système nitrogénase agit aussi comme hydrogénase et accompagne toute fixation d'azote. Cependant, certaines nodosités ne dégagent pas l'hydrogène parce qu'elles renferment une hydrogénase membranaire catalysant l'oxydation de H₂ par oxyhydrogénation. Dans ce cas l'accepteur final d'électrons est l'O₂ et une phosphorylation à lieu lui permettant la récupération d'une partie de l'énergie dissipée (Rhijn, 1995).

Les souches de rhizobia possédant une telle hydrogénase sont désignées Hup⁺ par contraste aux souches Hup⁻. Lors de l'association à une souche Hup⁺, les quantités

d'azote fixé et les rendements des légumineuses sont optimisés : il y a une régulation du niveau de l'activité de l'hydrogénase conduisant à un recyclage soit partiel de l' H_2 à la floraison, soit total au début du cycle et en fin de fructification. Il est à signaler que le fonctionnement de la nitrogénase est extrêmement sensible à la présence de toute forme combinée d'azote (Rhijn, 1995).

III.4. Rôle de la leghémoglobine

La leghémoglobine est synthétisée par les cellules des nodosités des légumineuse et concentrée dans les vésicules de séquestration indispensables à l'activité fixatrice, d'origine végétale entourant les bactéroïdes (Figure 4). C'est un pigment capable de complexer réversiblement l'oxygène libre pour lequel il a une forte affinité, donc joue le rôle de transporteur, sous forme combinée, de l'oxygène nécessaire aux activités respiratoires. Toutefois la présence de la leghémoglobine a pour conséquence que l'oxyde de carbone même à faible dose empoisonne définitivement la nitrogénase puisqu'il forme avec la leghémoglobine la carboxy-leghémoglobine stable. En général, l'absence de ce pigment responsable de la coloration rosâtre des nodosités est une caractéristique du phénotype Fix (Fox, 2005).



Source : lakhal,2012

Figure 4 : Leghämoglobine dans les cellules de nodosités des légumineuses.

IV. La fixation symbiotique de l'azote

On appelle fixation de l'azote le processus de transformation d'azote atmosphérique en ammoniac (Tortora, 2003). La fixation biologique de l'azote est le processus biochimique le plus important après l'assimilation du CO₂. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Vincent, 2002).

Il existe trois processus naturels différents, permettent la transformation de l'azote gazeux en azote assimilable par les plantes (Hopkins, 2003) :

- Les orages : au voisinage des éclairs, les hautes températures et pressions engendrées permettent la formation d'oxydes d'azote qui retombent au sol avec la pluie.
- Les bactéries et cyanobactéries fixatrices d'azote du sol : Le sol contient de nombreuses espèces de bactéries (*Clostridium*, *Klebsiella*, *Chromatium*) et de cyanobactéries « appelées aussi algues bleues » (*Anabaena*, *Nostoc*) pouvant transformer l'azote atmosphérique en ammoniac.
- Les bactéries des nodules de légumineuses : Les bactéries symbiotiques (*Rhizobium*) fixent N₂ des pores du sol et provoquent la formation sur les racines (ou par fois sur les tiges) de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules comme nous avons démontré dans les parties précédentes.

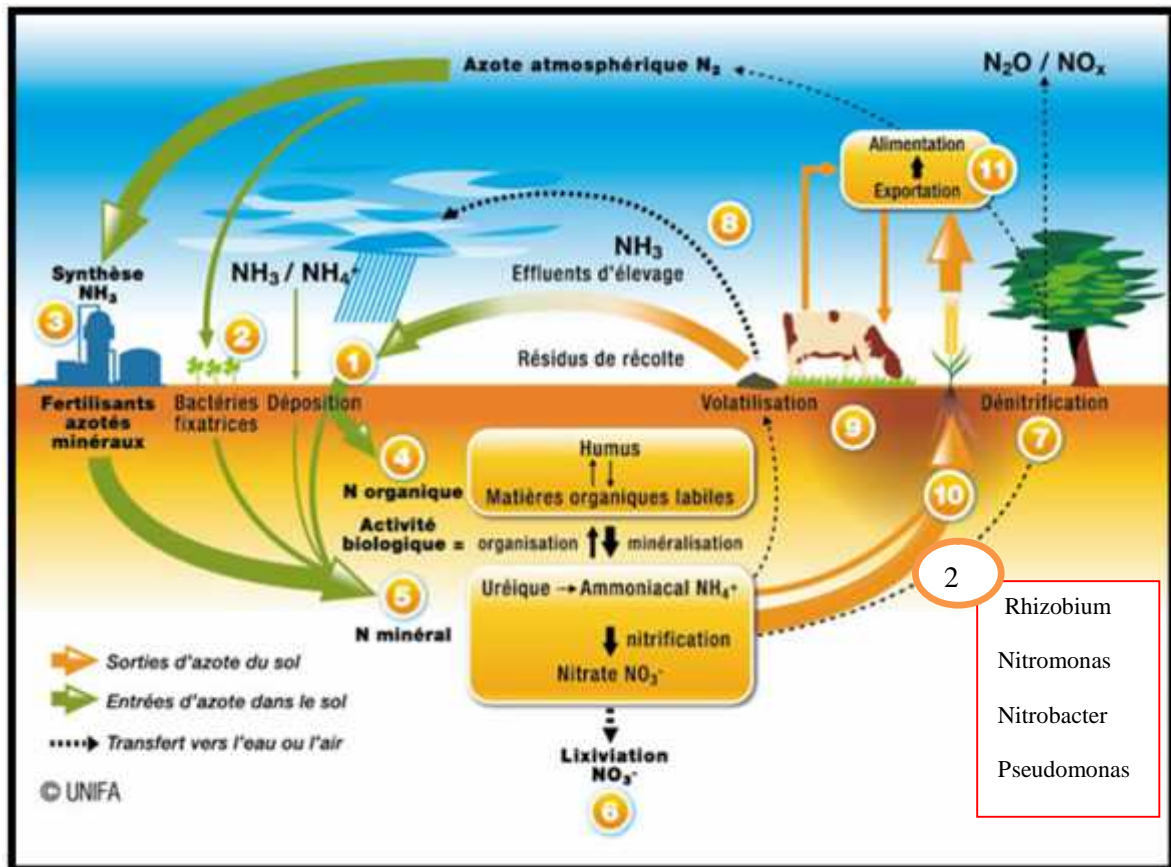
IV.1. Rôle de la fixation biologique dans le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est l'un des cycles biogéochimiques les plus complexes (Bockman et al., 1990; Ramade, 2003). Une représentation simplifiée d'après Tortora et al. (2003) est présentée sur la figure 5.

Le principal réservoir d'azote est l'atmosphère; l'azote gazeux (N₂) constitue en fait quelque 78% de l'atmosphère (Pelmont, 2005; Richlefs et Miller, 2005). La plupart des organismes vivants (animaux, végétaux, majorité des micro-organismes) ne peuvent cependant utiliser l'azote atmosphérique pour la synthèse de leurs acides aminés et des autres composés azotés; ils dépendent donc des molécules azotées plus réactives présentes dans le sol; comme l'ammonium et les nitrates. Ces molécules ne sont malheureusement

pas aussi abondantes que l'azote gazeux. Il en résulte que l'azote est souvent un facteur limitant dans les écosystèmes naturels ou cultivés (Léveque, 2001; Hopkins, 2003; Raven et al., 2003; Perry et al., 2004).

Un processus essentiel de l'entre d'azote dans le cycle est la fixation biologique de l'azote atmosphérique (Doré et al., 2006). C'est une étape très important du cycle de l'azote, qui fournit de l'azote utilisable pour la nutrition des plantes (Modigan et Martinko, 2007). La fixation biologique de l'azote capable de restituer à la biosphère l'azote combiné perdu par le phénomène de dénitrification (Berner et Berner, 1996; Doré et al., 2006; Rose et Mueller, 2006).



Source : Tortora et al.,(2003)

Figure 5 : le cycle de l'azote.

IV.2.les facteurs influençant la fixation biologique de l'azote

Le manque du phosphore limite sévèrement la formation des nodules et la fixation de l'azote (Somasegaran et Hoben, 1994). Il était démontré que des concentrations basses

de malate et du succinate stimulent la fixation de N₂ et des concentrations modestes de ces acides dicarboxyliques sont inhibitrices (Prell et Poole, 2006). L'éthylène inhibe la nodulation dans beaucoup de légumineuses (Sugawara et *al.*, 2006).

Une déficience d'eau induit une diminution significative dans le nombre et le rendement des nodules (Mnasri et *al.*, 2007).

Il est généralement admis que la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote, au moins en partie, en limitant le fonctionnement des nodosités par une baisse de leur conductance à la diffusion de l'oxygène. En plus, dans les régions arides et semi-arides, la salinité est un facteur majeur de la détérioration du sol et le rendre impropre pour l'agriculture (Saadallah et *al.*, 2001).

La sécheresse aussi est un facteur limitant de cette fixation (Zahran ,2001) ; cette dernière est affectée également par les hautes températures (Beaker et *al.*, 2004). Les facteurs du sol (édaphiques) jouent aussi un rôle important ; il existe un rapport négatif entre l'azote minéral contenu dans le sol et le taux de fixation. La richesse du sol en azote devient alors un facteur inhibiteur de la fixation biologique ; la synthèse de la nitrogénase est inhibée par la présence d'ions ammoniums ou nitrates, à un certain degré, dans le sol (Pietsch et *al.*, 2007). C'est ainsi que s'expliquent les effets dépressifs des engrais azotés sur la fixation de l'azote de l'air. La nature du sol et la disponibilité des éléments nutritifs influencent l'activité des rhizobiums et de la plante et l'efficacité de l'activité symbiotique (Babo et *al.*, 2002).

V. La contribution des rhizobiums dans la lutte biologique

De nombreux essais réalisés en lutte biologique ont mis au point le pouvoir des bactéries rhizobiale fixatrice d'azote dans l'inhibition de la croissance de certains micro-organismes phytopathogène (Lakhal, 2012).

En plus des bénéfiques nutritifs des Rhizobium cette dernière possède un effet protecteur des légumineuses contre les micro-organismes néfaste a sa croissance et la rendent plus résistante a certaine infections (Bordeleau, 1989), l'effet protecteur serait fait, par compétition sur la source de carbone généralement.

Le rhizobium est capable de persister dans le sol comme saprophyte en absence de la plante hôte, sa survie est donc possible grâce à l'expression de cératines activité es compétitifs indispensable pour la protection de sa niche écologique (Lakhal, 212).

V.1. Mécanismes d'antagonisme chez les rhizobiums

Certaines souches de *Rhizobium* ont été testé pour leurs pouvoir exercer sur la microflore du sol notamment les agents pathogène attaquant les légumineuses comme par exemple le *Trichoderma*, et *Fusarium oxysporum*.

Ces bactéries agissent de différente façon sur la suppression et l'inhibition de ces agents phytopathogène qui peut être soient par l'antibiose, soit par compétition, soit par compétition et production de sidérophores.

V.1.1. L'antibiose

L'antibiose est une forme d'antagonisme qui se produit lors de la sécrétion des toxines par une espèce bactérienne et qui agit contre les espèces située à sa proximité.

Les substances antifongiques peuvent exercer différent effet sur la population fongique qui peut être fongistatique, fongicide ou mycolytique (Brisbane., 1987).

Ainsi que des molécules secréter pour contrôler les bactéries pathogènes comme le rhizobactérine et l'agrocine produit respectivement par le *Rhizobium* et par *Agrobacterium radiobacter* K 84, sont utilisé avec succès contre la tumeur du collet (Lakhal, 2012).

V.1.2. Hydrolase

Les hydrolases des rhizobactéries extra cellulaire sont associées à l'inhibition des champignons phytopathogène. On a démontré la lyse de la paroi des parois chitine et les 13- glucane sont des composants majeurs de la paroi cellulaire de plusieurs champignons) *in vitro* par des chitinases ou des f- glucane bactérienne (Skuijns et *al.*, 1974).

V.1.3. La compétition

L'inhibition de *Fusarium oxysporum* par *Agrobactérium radibactère* est associer a un rapport de compétitions élevée (Marchal et Alexandre, 1960) des antagonismes de nature compétitive pour certaines maladies de plantes causer le *Rhizoctonia solani* ont été constaté (Garrit, 1965).

Antun et al.,(1978) ont prouvé que l'antagonisme entre le *Fusarium oxysporum* var. *avenneum* et *Rhizobium meliloti* est liée a la concentration de glucose d'où une compétition sur les nutriments. Des bactéries ne produisent pas d'enzyme lytique mais des substance antifongiques, inhibant la croissance mycélienne, inhibant la germination des oospores du *Pithium sp* on les privant de certains éléments nutritif (Elad et Chet, 1987).

V.1.3.1. Sidérophores et compétition

Des ligands de faible masse moléculaire spécifique au fer leur biosynthèses irrégulier par la disponibilité du fer est leur fonction et de fournir cette élément a la cellule (Lank et Ford, 1973). Sont classé en deux groupes les phénols-catéchols et les hydroxamates. Les hydroxamates sont le seul type produit par les champignons alors que les bactéries contiennent une plus grande diversité.

le fer est capable de participer dans les réaction d'oxydoréduction (grasse a ces deux valence stable).on le retrouve dans les enzymes himniques, tel les cytochromes et les hydroperoxydases , ainsi que chez la plupart des ribonucléases.

Il est abondant dans le sol sous forme d'oxyde de fer. C'est un facteur limitant pour la croissance de la flore bactérienne et de celle des plantes (shwertmann.et Lindsay., 1983).

L'implication des sidérophores dans l'antagonisme entre la population microbienne émergé de la disponibilité limité du fer. En réponse aux conditions limitantes en fer dans la rhizosphère, une compétition pour cet élément s'installe entre les micro-organismes (Lazellalen, 1997). Un nombre considérable d'espèces de *Rhizobium* producteur de sidérophores est cité par la littérature scientifique.

VI. Inhibition des champignons phytopathogène

VI.1. les sidérophores

(kloeppeper et al., 1980) et (Moore 1988) avancent que les rhizobiums producteurs de sidérophores, uniquement en absence de fer ; impose l'expression du phénotype d'inhibition de la croissance du micro-organisme phytopathogène visé. La synthèse de sidérophores a été utilisé comme méthode complémentaire à des technique sérologique pour différencier des isola de *R.leguminosarum*.

Pour isolé les souches dont la production de sidérophores peut compter dans un antagonisme, on vérifie leur capacité à inhiber la croissance radiale de champignons phytopathogènes. L'effet bénéfique de la production des sidérophores sur les plantes est expliqué par leur synthèse (induit lors de la croissance en condition limitante en fer) par les *Rhizobium*. Le fer complexé au sidérophores n'est assimilable que par les microorganismes producteurs ou possédant des récepteur membranaire spécifique capable de reconnaître les sidérophores (Mortan et *al.*, 2007). Sachant que la flore tellurique nuisible ralentit sa croissance est sa densité dans la Rhizosphère est diminué si elle est privé de fer.

VI.2. Rhizobactine des *Rhizobium*

(Smith et *al.*, 1985) trouvant que *Rhizobium meliloti* peut produire la rhizobactine (un acide aminopolycarboxilique avec une substitution éthylène diamine dicarboxyle hydrocarboxyle) comme groupement chélateurs. Les rhizobiums utilisent des acides comme des agents pour lutter contre les phytopathogènes est les ravageurs des légumineuses (Rioux et *al.*, 1986). La rhizobactine est apparentée structurellement aux opines (Guennot, 1991). Le *R. légumeinosarium* produit l'anthralinate (Guennot et *al.*, 1990). Alors que *B. japonicum* est capable d'utiliser l'acide citrique comme sidérophores.

VII. L'induction de la résistance systémique

De nombreuses bactéries rhizobiales qui ont été isolées sont capables de stimuler l'induction de la résistance systémique chez divers hôtes seulement que les principes actifs responsables de l'activité biologique de ces souches n'ont été que rarement identifiés.

Dépendant en partie des lipopolysaccharides et des flagelles présents à la surface des membranes bactériennes, la mobilité et l'adhésion racinaire des *Rhizobium* sont des éléments importants pour une colonisation effective de l'hôte (Persello-Cartio et *al.*, 2003).

Les quelques éliciteurs connus sont classés en trois catégories : les composants de surface cellulaire, les métabolismes réguliers par le fer et les antibiotiques (Angena et *al.*, 2007). La flagelline (dont l'activité biologique du flagelle pourrait être due à la partie N terminale de la flagelline d'après Gomez et *al.*, (2002), d'une même souche de rhizobium ne semble pas à stimuler l'ISR, chez la tomate et l'haricot, contre des champignons, ce qui suggère des propriétés différentes selon le photosystème étudié.

D'un autre côté on a démontré par l'utilisation d'extraits d'enveloppe de cellule de mutant, ou de composé purifié, le rôle des lipopolysaccharides (LPS) dans l'induction de la résistance. En effet, lors de l'ISR induite par certaines souches de *R. leguminosarium* et *R. elti* dans les LPS ont été testés avec des résultats positifs sur des pathosystèmes de divers pathogènes, tel que arabidopsis : *F. oxysporum* ; haricot : *B. cinerea* ; tabac : *Phytophthora nicotiana* et de pomme de terre ; cyst nématode (Van Wess et al., 1997).

Ces LPS sont constitués d'un noyau oligosaccharidique liant un groupement polysaccharidiques (anti gène O) à une chaîne lipidique lipide A, intégré dans la membrane externe des bactéries Gram négatives. Dans de nombreux cas l'utilisation de LPS possède une modification de la chaîne antigène O n'ont pas d'activité biologique, ce qui laisse à accorder un rôle à cette sous structure dans la reconnaissance par la plante (Vanloon et al., 1998).

I. Matériel biologique

I.1. Matériel végétal

Les plants de la luzerne ont été récupérés à partir de trois sites de différentes localisations au niveau de la wilaya de Laghouat : la région d'Elassafia ; la région de Gnifide, et la région de Laghouat centre. Le choix des sites n'est pas basé sur des caractères édapho-climatiques des régions mais surtout sur la disponibilité des plantes de *fabacées*.

Le prélèvement des échantillons a été réalisé au moment de la floraison, aléatoirement sur le champ, chaque plante a été prélevée en motte à une profondeur de 15 à 20 cm afin de garder les racines humides.

Les nodules ont été collectés à partir des racines des plantes récoltées toutes fraîches, les nodules sélectionnés pour l'isolement sont caractérisés par une coloration rose suite à la présence de l'enzyme de nitrogénase (Somasegaran et Hoben, 1985).

I.2. Matériel mycologique

Les souches de champignons utilisées pour le test de l'activité antifongique sont issues de la myco-thèque du département d'agronomie et de biologie de l'université de Laghouat.

Trois souches ont été utilisées dans l'essai ; la souche *Fusarium oxysporum* F.sp. *albidinis* ; *Fusarium oxysporum* F.sp. *lycopersicis*, et *Fusarium pseudograminirum* (figure 6)



Source : originale, 2015

Figure 6 : Aspect macroscopique du champignon *Fusarium pseudograminirum*.

II. Méthode de travail

II.1. le choix des nodules

Les nodules ont été récoltées à partir des racines de luzerne (figure 7) qui ont subi un rinçage à l'eau Courante pour éliminer les particules de sol, puis un nombre de 5 à 7 nodules a été collecté pour la réalisation de l'isolement.

Les nodules récoltés sont de couleur qui varie du blanc vert et rose, les nodules roses qui sont plus mature ont été gardés pour l'isolement car un nodule actif contient une protéine nommé leghaemoglobine dont sa présence dans le nodule est caractérisée par une coloration rose ou marron selon l'espèce. Les nodules qui se trouve à la surface et sont exposé au rayons du soleil devient verte suite au développement de la chlorophylle au niveau du cortex du nodule, alors quelles nodules qui prennent une coloration blanche sont inactives et cela est due à l'absence ou le manque du leghaemoglobine (Somasegaran et Hoben, 1985).

II.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

D'abord les nodules ont subi une désinfection superficielle suivant la méthode décrite par Somasegaran et Hoben, (1985) et consiste à effectué un trempage dans l'éthanol 95% pendant quelque secondes, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% suivi de 3 rinçages successives avec l'eau distillée stérile.

L'isolement est réalisé suivant deux techniques différentes, la première technique consiste à écraser les nodules dans une goutte d'eau distillée stérile puis étaler la suspension avec une pipette Pasteur en forme de râteau sur le milieu YMA (Yeast Manitol Agar, annexe I) dans des conditions d'asepsie totale, ou bien par des stries réaliser à l'aide d'une anse suivant la méthode de Somasegaran et Hoben (1985).

Pour la deuxième méthode, les nodules superficiellement désinfectées sont découpé en plusieurs morceaux avant d'être déposé sur le milieu de culture YMA (annexe I).

Après 3 jours d'incubation une température de 30°C, des colonies bactériennes entourant les fragments de nodules découpés et d'autres issues de l'ensemencement du broyat sont prélever afin d'être purifier sur milieu YMA (annexe I), en se basant sur les différents

aspects qui peuvent apparaître suite à l'ensemencement. Une série de repiquage successif a été réalisé pour assurer la pureté des isolats.

Les isolats purifiés ont été conservé dans des tubes stériles contenant du milieu de culture YMA (annexe I), à une température de 4°C.

II.3. La validité de la désinfection superficielle

Afin de s'assurer que les bactéries issues de l'ensemencement sont à caractère endophyte et que la désinfection superficielle a été bien réalisée, nous avons déposé un nodule entier (sans la découper) sur milieu de culture YMA (annexe I), puis nous avons incubé la boîte dans l'étuve à 30 °C pendant 3 jours.

II.4. Identification phénotypique des isolats

La morphologie des bactéries a été étudiée, en notant, la couleur, l'aspect, et la taille des colonies bactériennes des isolats.

II.4.1. Test de Gram

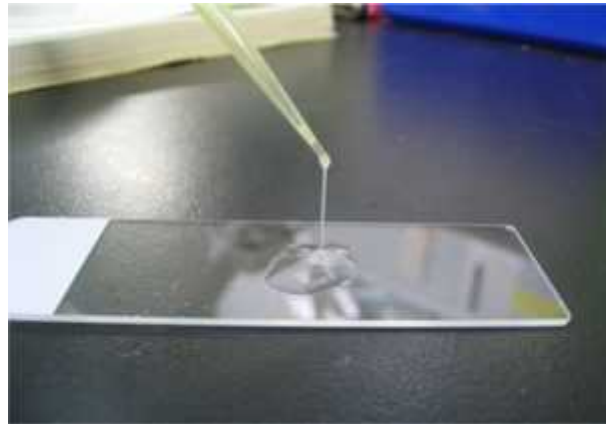
En plus de ces notations un test de Gram a été effectuée et qui comprend le test de KOH et la coloration de Gram et cela pour différencier les isolas à Gram négatif et les isolats a Gram positif.

II.4.1.a. Test de KOH

Le test de KOH repose sur le différents comportement des bactéries lors de leurs contacte avec la solution d'hydroxyde de potassium 3%.

La méthode consiste à déposer une goutte de solution de KOH 3% sur une lame, puis prendre une colonies des isolats testés et la mélanger avec la goutte en créant des mouvements circulaires, le changement de l'aspect du mélange et la formation d'un fil visqueux (figure 8) indique que la bactérie est une Gram négatif (Bejot, 2015).

Le but de ce test est de faciliter la sélection des isolats susceptible à être des rhizobiums et cela par l'élimination des isolats qui présente des réactions négatives.



Source : Jjikaos.testory.com

Figure 7 : Réaction positive du test KHO 3%

II.4.1.b. Coloration de Gram

Cette technique consiste à soumettre un frottis bactérien séché à l'action de différents colorants et produits. Le frottis est réalisé suite à un étalement d'une quantité de bactérie dans une goutte d'eau distillée stérile sur la lame.

La première coloration se fait avec le violet de Janthiane, puis avec une morduration avec le lugole (solution iodo-iodurée). À ce stade le cytoplasme de toutes les bactéries prend la coloration violette, puis vient l'étape la plus délicate qui est la différenciation à l'éthanol qui consiste à soumettre les frottis bactérien coloré à l'action de l'éthanol.

Certaines bactéries possèdent une paroi imperméable à l'éthanol, celles-ci restent donc colorées en violet ; elles sont des Grams positives.

D'autres qui ont une paroi perméable à l'éthanol dans les mêmes conditions opératoires sont décolorées, ce sont des bactéries Gram négatives.

La dernière étape de la recoloration est celle du rose de fushine, elle permet la coloration des bactéries à Gram négatives (Perrier et al, 1997).

Après séchage les lames ont été observées sous microscope optique à l'objectif 100, en ajoutant de l'huile à immersion.

III. Caractérisation physiologiques et culturels des isolats

III.1. La croissance des isolats sur différents milieux de culture

Les caractères culturels des isolats ont été étudiés sur différents milieux de cultures qui sont le YMA additionné de rouge congo (RC), YMA additionné de pourpre de bromocrésol (BCP), YMA additionné de bleu de bromothymole (BTB) et la croissance sur milieu glucose peptone agar (GPA). La croissance des isolats a été notée après 24h d'incubation à une température de 30 °C.

- Croissance sur YMA+ rouge congo

La croissance des bactéries sur milieu additionné de rouge congo a été testée. Il est rapporté que les souches appartenant à l'ordre des rhizobiaceae prennent une coloration légère du rouge ou bien reste totalement blanche (Somasegaran et Hoben, 1985).

- Croissance sur milieu YMA+ bleu de bromothymole

L'ensemble des isolats obtenus ont fait l'objet de test de croissance sur milieu YMA additionné de bleu de bromothymole qui prend une couleur verte et cela afin de différencier les souches ayant la capacité d'acidifier le milieu en changeant sa couleur (Somasegaran et Hoben, 1985). Les isolats qui ont la capacité de changer la coloration du milieu seront pris en considération.

- Croissance sur milieu YMA+ pourpre de bromocrésol

Des boîtes de Petri contenant le milieu de culture YMA additionné de pourpre de bromocrésol ont étéensemencées avec nos isolats, pour différencier les souches rhizobiales des souches contaminantes qui changent la couleur du milieu du violet au jaune contrairement aux bactéries concernées qui prennent la coloration violette ou bleuâtre (Grama, 2008).

- Croissance sur milieu Glucose peptone agar :

La croissance des isolats dans le milieu YMA contenant le peptone glucose agar a été testée. La croissance des souches a été notée (Chitra, 2013).

III.2. Effet de la température

Nous avons testé la capacité des isolats à se développer sous l'influence de différentes températures (4 °C, 35°C, 40°C, 45°C, et 50°C). La croissance des bactéries a été notée après trois jours d'incubation (Lakhal, 2012).

III.3.Effet du pH

Les isolats obtenues ont étéensemencé dans des boites de Pétrie contenant le milieu de base YMA (annexe I) à différent degré de pH (5, 6, 7, 8, 9, 12) les notations ont eu lieu trois jours après l'incubation à 30°C (Mouafek, 2010)

III.4. Tolérance à la salinité

Un test de tolérance à la salinité a été réalisé sur milieu YMA (annexe I) contenant les différents types de sels. Les sels concerner sont : le NaCl, K₂PO₄, CaCl₂, N₂SO₄, et le KCl, avec des concentrations de 0.5%, 1%, 1.5%, et 2%. Après trois jours d'incubation à 30°C la croissance des isolats a été notée (Mouafek, 2010).

Tous les tests physiologiques et culturaux ont été réalisés à raison de deux répétitions par test.

IV. Caractérisation biochimique des isolats

Le comportement biochimique des isolats a été mis en évidence par la réalisation du test oxydase pour quelques souches et de 20 autres tests réunis dans une plaque (Galerie API 20 NE) sous forme de milieu déshydraté.

IV.1. Test de l'activité oxydase

Le test de l'activité oxydase des isolats obtenus a été réalisé et cela afin de confirmer si nos isolats sont des oxydases négatives ou oxydase négatif.

D'après Confida (2011) ; L'oxydation du N di amine paraphénylène diamine est fait suite à la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase intracellulaire et l'oxygène moléculaire ce qui donne comme résultat une couleur bleu violette qui indique à son tour que les isolats sont des oxydases positifs.

Le test que nous avons effectué consiste à imbiber les disques oxydase avec une goutte d'eau distillée stérile, puis par la suite et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile nous avons prélevé une colonie que nous avons déposée sur les disques en formant une ligne.

Les isolats considéré comme des oxydases positives sont gardé pour subir le test de la galerie API 20 NE.

IV.2. Les galeries API 20 NE

Cette galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactérie te non fastidieux elle réunit 20 tests à la fois dont 8 sont conventionnelles et le reste sont d'assimilation. Pour l'inoculation de la galerie nous avons suivi les recommandations du fabricant biomireo (2009).

Les microtubes qui contien la galerie sont des milieux de culture en état déshydraté, les tests conventionnels ont été inoculés avec une suspension bactérienne saline qui va reconstituer le milieu.

Après la période d'incubation les réactions se traduisent par un changement de couleur spontanée ou bien due à des ajouts de réactifs, les tests d'assimilation sont révélés alors par la présence ou absence des troubles ou pas sur les cupules inoculées.

La lecture des résultats à été effectuée après 24 h a 48 h d'incubation à 30°C en utilisant le tableau (2) de lecture fournis par le fabricant.

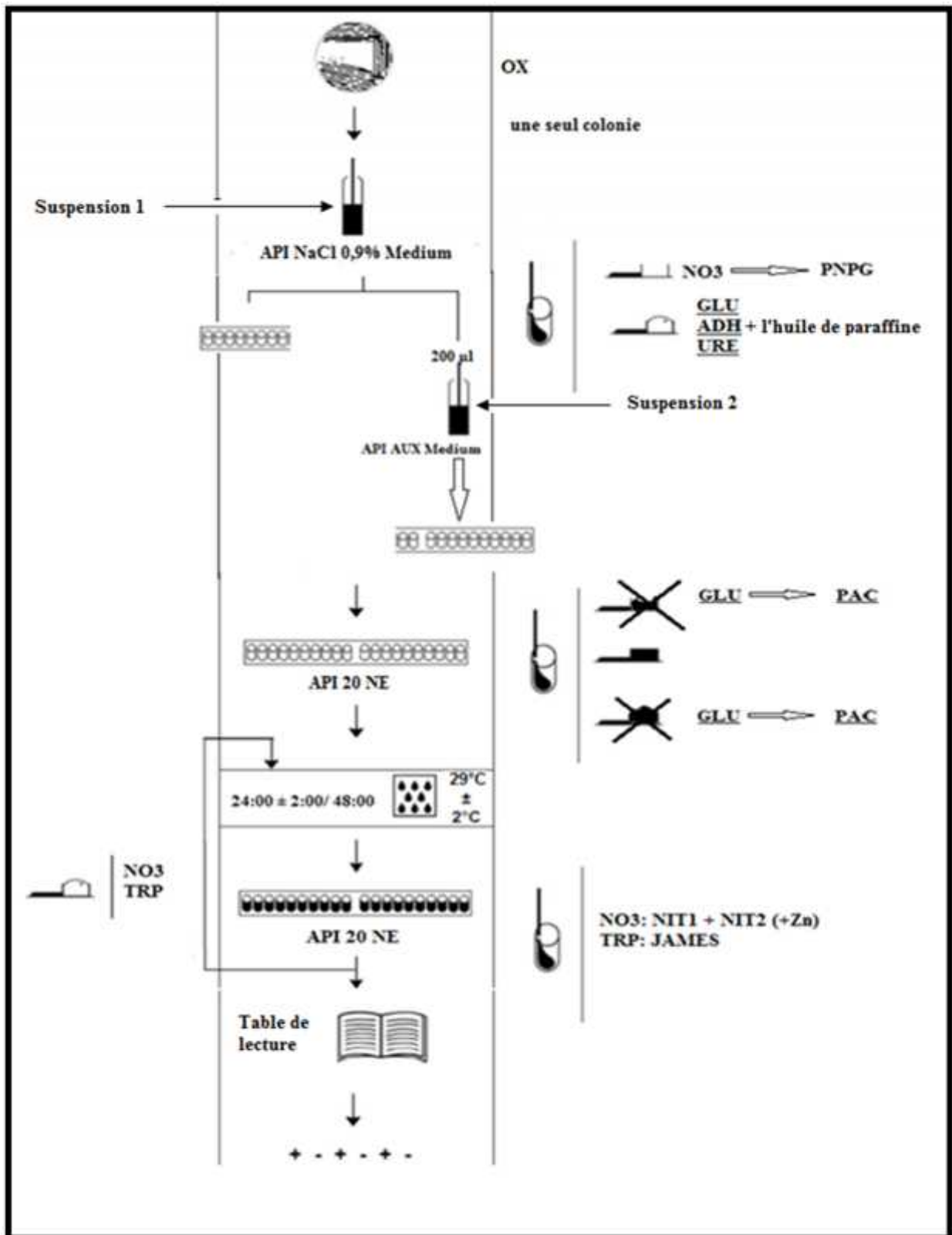
IV.1.1. la préparation des suspensions

Deux suspensions bactériennes ont été préparées pour l'inoculation de la galerie API 20NE nous avons réalisés deux méthodes différentes selon la nature du test et ces exigences, pour les tests conventionnels la solution d'inoculation a été issue d'une à quatre colonies bactériennes âgé de 24h et disperser dans 2ml d'eau physiologique à 0.9%. Pour les tests d'assimilation la suspension a été Prépare en ajoutant 200 µl de la première suspension dans une ampoule de milieu 0.85 Na Cl, fourni avec la galerie.

Les solutions ont été mises dans les tubes qui leurs convient à l'aide d'une pipette Pasteur stérile en évitant la formation des bulles d'air (Figure 9).

Les cupules des tests TRP, GLU, et ADH, ont été remplis avec l'huile de paraffine pour créé un environnement d'anaérobiose.

La lecture des résultats a été faite après 24h et 48 h d'incubation à une température de 30°C, à l'aide d'un guide (voir tableau 2)



Source ; guide biomirio, 2009

Figure 8: méthode de préparation de la suspension d'inoculation de la galerie API NE 20

Tableau 2. Table de lecture de la galerie API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de potassium	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2 / 5 min	
				Incolore	Rose rouge
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min	
				Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat	
				vert pâle jaune	Rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange rose rouge
<u>URE</u>	Urée	0,76	UREase	Jaune	orange rose rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris Marron Noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- D- galactopyranoside	0,22	-galactosidase (Para-NitroPhényl - D- Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	Assimilation arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,4	Assimilation mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,36	Assimilation mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine	1,28	Assimilation N-acétyle-glucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,4	Assimilation maltose	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	Assimilation potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	0,78	Assimilation acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	1,12	Assimilation acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	acide malique	1,56	Assimilation acide malique	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	Assimilation trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	Assimilation acide phénylacétique	Transparence	Trouble

Source : guide biomirio, 200

V. Essai de l'antagonisme *in vitro*

L'ensemble des isolats obtenue en forme de bacille ont fait l'objet de l'étude de l'activité antifongique vis-à-vis de trois souches phytopathogène appartenant au genre *Fusarium* ; *Fusarium oxysporum F. sp. lycopersicis* ; *Fusarium oxysporum F.sp. albidinis* et *Fusarium pseudograminearum* par la méthode de confrontation directe par la méthode de sapote bactérien décrite par Rocher (2004).

Le test de l'activité antifongique consiste à prélever une loupe de l'isolat bactérien et l'ensemencer sur le milieu de culture PDA (annexe I) à 1 cm de la périphérie de la boîte de Pétri et laisser à l'incubation à une température de 30°C pendant 24h. Un disque de 6mm de diamètre du champignon testé est déposé au centre de la boîte (figure 3) l'essai est réalisé à raison de deux répétitions.

Le témoin a été représenté par la culture du champignon tout seul et l'incuber dans les même conditions du test.

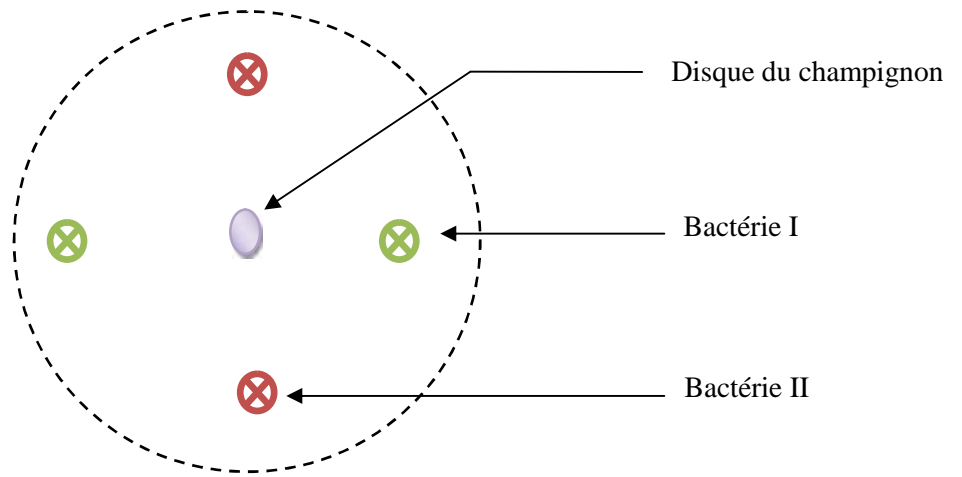
Après 5 jours d'incubation à 25°C nous avons mesuré la croissance du champignon en présence et en absence des isolats pour calculer le taux d'inhibition, en utilisant la formule décrite par Hamouni et *al.*, (1996) :

$$I\% = (1 - D_{PA}/D_T) * 100$$

I% : Représente le taux d'inhibition.

D_{PB} : Représente la croissance mycélienne radiale du pathogène en présence de l'isolat bactérien.

D_T : Représente la croissance mycélienne radiale en absence du champignon testé.



Source : originale, 2015

Figure 9 : Essai de l'antagonisme des isolats bactériens

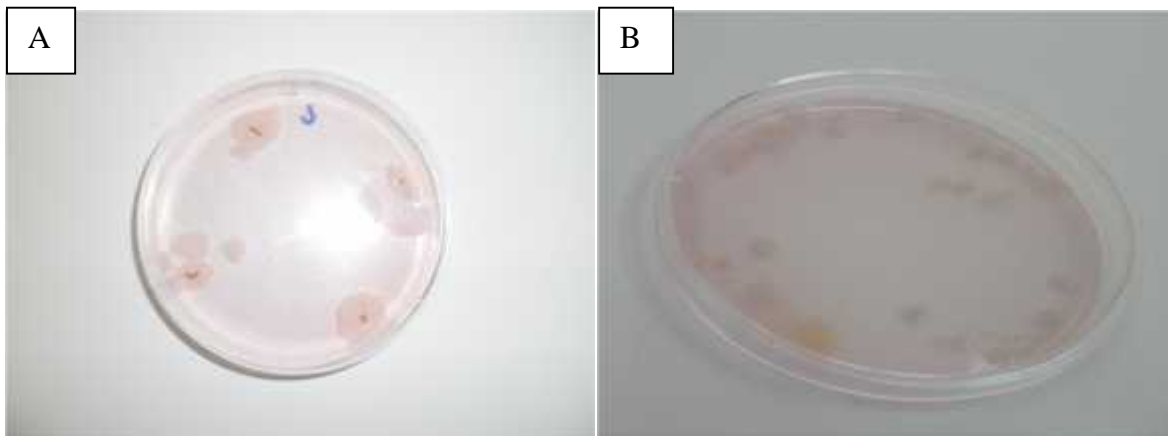
I. Résultats et discussions

13 isolats bactériens issus des travaux d'isolement et de purification ont fait l'objet d'une identification préliminaire basé sur les caractères morphologiques physiologiques et surtout biochimiques notamment l'activité oxydase et l'anaérobiose des isolats obtenus.

Les résultats des tests effectués sont les suivants :

I.1. Isolement des bactéries

Après une période d'incubation, nous avons remarqué sur milieu YMA (annexe I) pour la première technique d'isolement l'apparition des colonies autour des fragments des nodules. La même remarque pour les boîtes contenant le broyat nous avons remarqué quelques colonies dispersés sur le milieu comme le montre la figure 10.



Source : *originale, 2015*

Figure 10 : Bactéries issues des deux techniques d'ensemencements ; A à partir des fragments de nodules ; B à partir de la solution du broya.

A partir de ces cultures nous avons retenue 13 isolats de différents aspect apparut sur le milieu de culture

Une fois que nos isolats sont purs (figure 11) nous avons entamé des tests de caractérisation morphologique, culturale, physiologique et biochimique.



Source : originale,2015

Figure 11 : isolat bactérien pure.

I. 2. La validité de la désinfection superficielle

Afin de démontrer que la désinfection superficielle des nodules de luzerne a été bien effectuée, et que tous les isolats bactériens sont des endophytes nous avons déposé un nodule entier sur milieu de culture YMA et nous l'avons laissé à incubation pendant une semaine à une température de 30°C.

Après l'incubation la boîte contenant le nodule ne présente aucune croissance bactérienne ou fongique et ce qui indique que la désinfection a été très bien réalisée (figure 12).



Source : originale, 2015

Figure 12: nodule de luzerne désinfecté superficiellement après incubation.

I.3. Caractères morphologiques des isolats bactériens

Les caractères morphologiques macroscopique des isolats sont mis en évidence à partir de colonie développées sur milieu YMA après 24 h d'incubation à 30°C, suite à des observations effectués à l'œil nu en notant le diamètre l'aspect et la couleur de ces derniers.

I.3.1. Test de Gram

I.3.1.a. Test KOH

Suite à ce test 13 isolats ont montré une réaction positive, cela veut dire que ce sont des Grams négatifs alors que 10 isolat n'ont montré aucun changement lors de leur contacte avec la solution de KOH donc ce sont des Grams positifs.

Les Gram positifs ont été éliminés alors que les Gram négatifs ont été gardés pour effectuer le reste des tests de caractérisation.

I.3.1.b. Coloration de Gram

L'observation microscopique à l'objectif (100) a confirmé que les isolats retenus sont des Gram négatifs de deux formes cocci et bacille.

11 isolats sont en forme de bacille de petite taille et arrondie à la périphérie. Ces résultats sont similaires avec les résultats obtenus par les travaux de Mouafek, (2010) alors que les isolats soLg2, Lg2c et La9 sont des cocci de couleur rose (tableau 3).

Tableau 3 : les caractéristiques morphologiques des isolats observés sous microscope optique à l'objectif 100

Isolat/Observation	Couleur	Forme	Gram
Lg2c	Rose	Cocci	-
Lg2	Rose	Cocci	-
La9	Rose	Cocci	-
La5	Rose	Bacille	-
La8	Rose	Bacille	-
La6	Rose	Bacille	-
La3	Rose	Bacille	-
La6'	Rose	Bacille	-
La3'	Rose	Bacille	-
La7/8	Rose	Bacille	-
La7/8'	Rose	Bacille	-
La5t	Rose	Bacille	-

(-) : Gram négatif

D'après le tableau 3 nous avons constaté que la majorité des isolats possèdent un aspect translucide avec une coloration blanchâtre d'un diamètre qui varie entre 3mm à 6 mm, alors que l'isolat La8 a présenté une coloration beige avec un aspect lisse et crémeux avec un diamètre de colonie qui varie de 3mm à 4 mm. Les isolats La3 et La7/8 se caractérisent par une coloration crème et un aspect lisse et crémeux avec un diamètre qui varie entre 3mm et 4 mm.

Tableau 4 : Caractères morphologiques des isolats observé a l'œil nu

Isolat/Caractères	Diamètre (mm)	Aspect	Couleur
La5	6	Translucide	Blanche
La8	3-4	Lisse crémeux	Beige
La6	3-4	Lisse crémeux	Blanche
La3	4	Lisse crémeux	Crème
La6'	4	Lisse crémeux	Blanche
La3'	3	Lisse crémeux	Blanche
La5	5	Translucide	Blanche
La7/8	3	Lisse crémeux	Crème
La7/8'	3	Translucide	Blanche
La5t	6	Translucide	Blanche

I.4. Caractéristiques cultureux des isolats

La croissance des isolats et leurs comportements sur différents milieux de cultures a été testé sur milieu YMA additionné de RC tous les isolats ont présentés une coloration rose après incubation à l'obscurité, en plus d'un virage du milieu YMA additionner de BTB à cela indique que nos isolats ont pu acidifier le milieu ce sont donc des bactéries à croissance rapide à l'exception des isolats La5, et La5t. Cinq isolats (La8, La3, La5, La7/8' et La8') ont changé la coloration du milieu YMA additionner de BPC du violet au jaune, alors que le reste des bactéries ont pri la coloration violette du milieu (figure 13). Tous les isolats ont pu croitre sur milieu Glucose Peptone Agar.

Tableau 5 : le comportement des isolats bactériens sur différent milieu de culture.

Isolats/ Milieu	RC	BTB	BPC	GPA
La5	C	Vert	Violet	+
La8	Rose	Jaune	Violet	+
La6	Rose	Jaune	Violet	+
La3	Rose	Jaune	Jaune	+
La6'	Rose	Jaune	Violet	+
La3'	Rose	Jaune	Violet	+
La7/8	Rose	Jaune	Violet	+
La7/8'	C	Jaune	Jaune	+
La8'	Rose	Jaune	Jaune	+
La5t	Rose	Vert	Violet	+

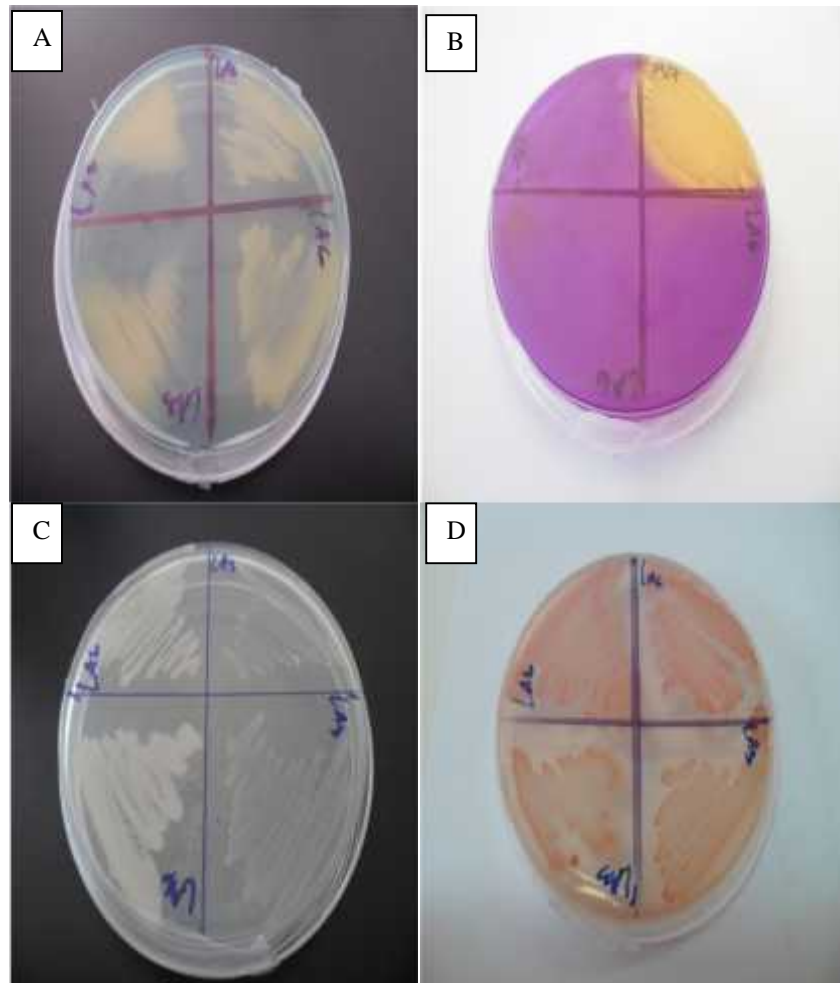
+ : Croissance, C : Contamination

CR : rouge congo

BTB : bleu de bromothymole

BPC : pourpre de bromocrésolé

GPA : glucose peptone agar



Source : originale, 2015

Figure 13 : le comportement des isolats bactérien sur les différents milieux de culture A ; B ; C ; D.

A : milieu YMA+ BTB

B : milieu YMA+BCP

C : milieu GPA

D : milieu YMA+ RC

I.5. Caractérisation physiologique

Pour une caractérisation physiologique trois tests ont été réalisés pour étudier l'effet de pH, la température, et la tolérance de la salinité

I.5.1. Effet du pH

L'effet du pH sur la croissance et le développement des isolats bactériens a été étudié sur milieu YMA à différents degrés de pH, les résultats obtenus ont montré que tous les isolats tolèrent les différents degrés de pH qui varient de pH acide, neutre, à alcalin (tableau 6).

Tableau 6 : la croissance des isolats à différents degrés de pH

Isolats/pH	5	6	7	8	9	12
La5	+	+	+	+	+	+
La8	+	+	+	+	+	+
La6	+	+	+	+	+	+
La3	+	+	+	+	+	+
La6'	+	+	+	+	+	+
La3'	+	+	+	+	+	+
La7/8	+	+	+	+	+	+
La7/8'	+	+	+	+	+	+
La5t	+	+	+	+	+	+

+ : croissance

I.5.2. Effet de la température

L'influence de la température sur la croissance des isolats bactériens a été effectuée et cela par l'incubation de ces derniers dans des températures variant de 4 °C jusqu'à 50°C.

D'après le tableau 7 les résultats ont montré que les isolats ont présenté tous une croissance à la température 35 °C alors que les isolats La5, La8', et La5t n'ont pas pu se développer, seuls les isolats La6, La3, La6', et La7/8 ont pu croître à une température de 45°C, la plus part des isolats n'ont pas présenté une croissance à la température de 50°C à l'exception de deux isolats (La6, et La6').

La température 4°C représente la plus basse température de l'essai la croissance de la majorité des isolats a été notée à part les isolats La5, La6', La7/8 et La8'.

Tableau 7 : la croissance des isolats bactérien sous l'influence de différentes températures

Isolats/ Temp	4°C	35 °C	40°C	45 °C	50 °C
La5	-	+	-	-	-
La8	+	+	+	-	-
La6	+	+	+	+	+
La3	+	+	+	+	-
La6'	-	+	+	+	+
La3'	+	+	+	-	-
La5t	+	+	-	-	-
La7/8	-	+	+	+	-
La8'	-	+	-	-	-
La7/8	+	+	+	-	-

+ : croissance, - : absence

I.5.3. Effet de la salinité

La résistance des isolats et leurs capacité a toléré différents types de sels à différentes concentration a été étudiés, le tableau 8 représente les notations effectué a propos de la croissance des isolats bactériens.

D'après les résultats obtenus nous constatons que nos isolats bactériens sont tous tolérants à la salinité à différents degrés à l'exception de quelques isolats qui n'ont pas supporté les concentrations de 1, 1.5 et 2 % des sels. Seul le N_2SO_4 qui a été toléré à ces quatre concentrations.

Tableau 8: Effet de la salinité sur la croissance des isolats bactériens.

Test/souche		La ₅	La ₈	La ₆	La ₃	La ₆	La ₃	La _{7/8}	La ₈	La _{7/8}	La _{5t}
NaCl	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KCl ₂	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CaCl ₂	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₂ SO ₄	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K ₂ SO ₄	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

+ Croissance ; - pas de croissance ; / non réalisé

II. Caractéristiques biochimiques des isolats bactériens

Afin d'effectuer une caractérisation des propriétés biochimique des isolats nous avons opté pour la réalisation de ses test sur galerie API 20 NE sous forme de tube déshydraté.

Les tests concernés sont les tests conventionnels et des tests d'assimilation dont les résultats sont réunis dans le tableau qui suit :

Tableau 9: résultats des tests biochimiques effectués à l'aide de la galerie API 20 NE

Test/souche	La8/7	La8/7	La5t	La8	La6	La6	La8	La5	La3	La3
NO ₃	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
ADH	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
URE	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
ESC	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
GEL	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
PNG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CAP	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
ADI	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAC	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Oxy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Test positif, - Test négatif

Il est à noter que tous les isolats possèdent une activité oxydase positive.

Les tests conventionnels sont effectués pour étudier la capacité des Isolats à transformer des produits à l'aide des enzymes, une réaction positive révèle la présence d'une réaction enzymatique (après addition de réactifs appropriés pour le test NO₃ et TRP).

- Réduction de nitrate (NO₃) : en ce qui concerne ce test tous les isolats possèdent une enzyme de réduction des nitrate en nitrite ou bien en azote à sauf les deux isolats La6' et La7/8.
- Production de l'indole (TRP) : tous les isolats ont montrés une réaction négative vis à vis de la production de l'indole.

- Fermentation de Glucose (GLU) : 50% des isolats ont pu fermenter le glucose alors que le reste ont présenté une réaction négatif ce qui explique que ces derniers sont des anaérobies.
- Hydrolyse de l'esculine (ESC) : tous les isolats ont une activité d'hydrolyse sauf la souche La8.
- Hydrolyse de gélatine (GEL) : la plus part des souches ont présentés une réaction négatif alors que cinq isolats seulement ont présentés une réaction positive.
- Présence de B-galactosidase : 49% des isolats bactériens possède cette activité alors que le reste a présenté une réaction négative.

Les tests d'assimilation sont réalisés afin de définir la capacité des isolats bactériens dans l'utilisation de différents types de sucres. La majorité des isolats sont capables d'assimiler la plus part des sucres GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MLT, CIT. Seul l'isolat La5t n'a pas pu assimiler le MAL, la même chose pour l'isolat La6' vis à vis de l'assimilation du GNT, quatre isolats et cinq autres n'ont pas pu assimiler respectivement les sucres CAP et PAC.

D'après la lecture des résultats nous avons obtenu, cinq souches seulement sont susceptibles a être des bactéries rhizobiale (La7/8', La8', La6, La6', et La5t).

III. Essai de l'activité antifongique *in vitro*

Nous avons étudié l'effet de 7 isolats bactérien (La8, La6, La6') choisis aléatoirement sur la croissance de trois champignons phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium*. Les isolats ont pu inhiber la croissance des champignons (figure 14).



Source : originale, 2015

Figure 14 : Résultats de l'activité antifongique de la souche La6 en confrontation directe avec le champignon *Fusarium oxysporum* F. sp. *albedinis*

Le taux d'inhibition exercée par les isolats a été mesuré en utilisant la formule décrite par Hammouni et *al.* (2006) est qui es représenté par les graphes 16, 17, et 18 pour chaque souche fungique. Pour les trois champignons nous remarquons que la croissance a été empêchée mais à différents degré.

Chez le FOL les isolats La8, La6, La6', et La5 ont exercé une inhibition importante qui varie de 70% a 68.33%.

En ce qui concerne le FOA le taux d'inhibition exercer par les isolats varie entre 23.33% et 48.33%, la souche La6 à présenté l'inhibition la plus importante.

L'isolat bactérien La6 a également présenté une inhibition importante de la souche *Fusarium pseudograminearum* (41.46%), alors que le reste ont exercés une inhibition moins importante.

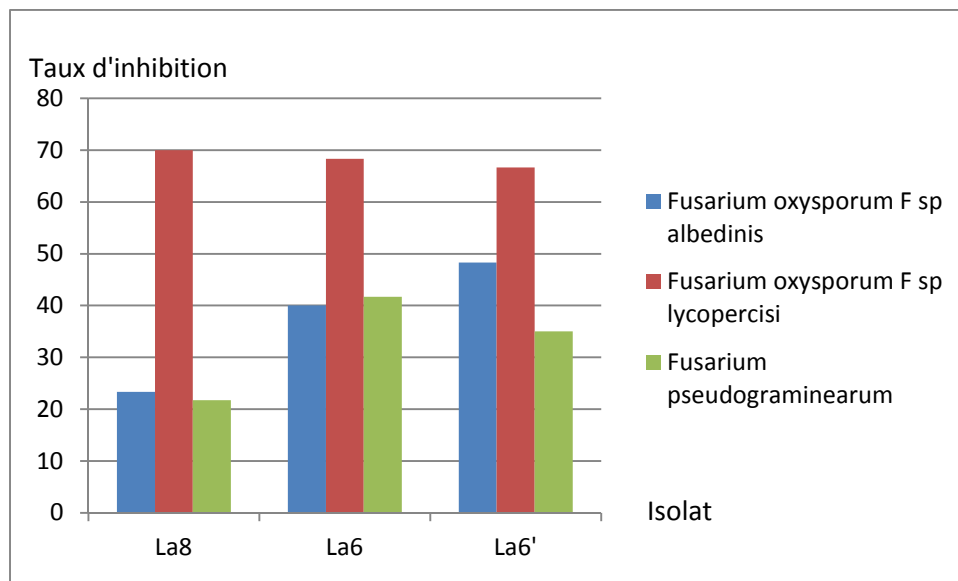


Figure 15 : taux d'inhibition des isolats bactériens sur la croissance mycélienne de

Fusarium oxysporum F. sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopercisi*, et *Fusarium pseudograminearum*.

IV. Discussion

Notre étude a fait l'objectif de l'isolement des bactéries nodulant la luzerne prélevé de trois régions de la wilaya de Laghouat et la réalisation de différents tests de caractérisation morphologique cultural physiologique et biochimique en plus du test de la capacité inhibitrice des isolats vis à vis de trois champignons phytopathogène (*F. pseudograminearum*, *F. oxysporum* F. sp. *albedinis*, et *F. oxysporum* F. sp. *lcopercisi*).

L'isolement des bactéries nodulant les légumineuses a été anciennement effectué par Somasegaran et Hoben, (1985) comme un point de départ, sur la culturabilité de microsymbiont bactérien dans le nodule une foisensemencé sur Yeast Mannitol Agar (YMA). Malgré la transformation physiologique des formes végétatives à la forme bactéroïdes qui ne se divisent pas, il est observé que le rhizobia est régulièrement trouvés dans les nodules. Ceci implique que quelques formes végétatives n'ont pas subi la conversion en bactéroïde (Paau et al, 1980; Timmers et al., 2000), ou quelques bactéroïdes peuvent être réanimé de nouveau à l'état culturable, ou tous les deux possibilités ce qui signifie nos résultats d'isolement obtenue et la possibilité que les bactéries isolées a partir des nodules soit des rhizobiums.

L'obtention de 23 isolats bactérien après une série de purification successif a ouvert la porte pour d'autre test de caractérisation morphologique, culturale, physiologique, ainsi que biochimique, afin d'effectuer une identification préliminaire de ces isolats bactériens.

L'identification morphologie des isolats a été réalisé en se basant sur le test de Gram qui comprend le test de KOH, et qui nous à permis d'effectuer une distinction précoce entre les isolats à Gram négatif et les isolats à Gram positif en se basant sur la structure de la paroi de ces dernier et au changement que peut la solution de KOH effectuer lors d'une réaction positifs. Après avoir effectué ce test nous avons éliminé 10 isolats à Gram positif suite a une réaction négatif avec la solution de KOH.

La solution de KOH 3% présente une action destructive sur la paroi des cellules des bactéries à gram négatif alors qu'elle ne fait rien pour la paroi des cellules bactérienne à Gram positive. Lorsque une portion bactérienne est mélanger avec un petit volume de solution KOH 3% pendant un temps qui ne dépasse pas 60s, cela provoque une lésion de la paroi de la cellule suivit de la libération de l'ADN ce qui donne un aspect visqueux au mélange, cette réaction obtenu est un résultat positif qui indique que la bactérie est une Gram négatif (Bejot, 2015).

Contrairement à la bactérie Gram positif qui ne présente aucun changement du mélange la réaction donc est négatif.

Pour confirmer nos isolats surtout que nos isolats sont bien des Grams négatifs, et connaître la morphologie microscopique des *Rhizobium* qui ont une forme de bacille d'après les travaux de Somasegaran et Hoben, (1985).

D'après les résultats de la coloration de Gram, les 13 isolats sont des Gram négatifs mais seulement 11 isolats ont une forme de bacilles et trois isolats ont une forme de cocci (Lg2c, Lg2, et La9), ce qui indique la possibilité de présence d'autre bactérie au niveau du nodule et cela est confirmé d'après le test de la validité de la désinfection superficielle.

Il a été rapporté que chez certaines légumineuses, notamment du genre *Hedysarum*, les souches de rhizobia sont associées aux nodules avec d'autres bactéries endophytes (Balachandar et al., 2007, Muresu et al., 2008, et Zakhia et de Lajudie, 2006 Benhizia et al., 2004).

Brundu et al. (2004) ont examinés 15 espèces sauvages de *Medicago* en Sardaigne et isolées 125 bactéries de ces nodules: seulement 29 pouvaient re-noduler leurs plante-hôtes, les 94 isolats restants étaient des saprophytes. Dans d'autres cas l'analyse des nodules de quatre espèces de *Hedysarum* examinées en Algérie, par PCR directe du jus de nodule indique la présence des groupes non- rhizobials, et met en évidence l'absence du *Rhizobium*, les « résidents » cultivables des nodules, et la présence de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* et d'autres, qui produisent une pseudoculture de croissance au lieu des colonies d'isolement (Benhizia et al., 2004). L'abondance de ces endophytes bactériens au sein des plantes suggère que d'autres types d'interaction (Ben Romdhane et al., 2005).

Les caractères morphologiques des isolats que nous avons obtenu sont pour la plus part d'un aspect visqueux et translucide de coloration blanche laiteuse et d'un diamètre qui varie de 3 mm à 6 mm ce qui a été révélé par les travaux de Somasegaran et Hoben, (1985).

D'autres colonies caractérisées par un aspect lisse et crémeux d'une coloration crème à beige ont été aussi révélées dans les travaux de Somasegaran et Hoben, (1985).

La coloration qu'auraient les isolats lors de leur culture sur milieu YMA en ajoutant le RC est rose, il est rapporté que les bactéries rhizobiales prennent une coloration blanche ou

légèrement rose lors de leurs culture sur milieu YMA additionner de RC à l'obscurité. (Somasegaran et Hoben, 1985 et lakahal, 2012).

Sur milieu YMA additionner de BTB, La plus part des isolats ont pu acidifier le milieu et cela par un virage de la coloration verte au jaune, cette caractéristique est bien identique a celle des bactéries rhizobiale à croissance rapide selon les travaux de Somasegaran et Hoben, (1985). Les bactéries nodulant les racines de la luzerne sont classés parmi les espèces bactérienne à croissance rapide (Sbihi, 2008).

Le but de la culture des isolats sur milieu YMA additionner de BCP est de distinguer les souches a croissance très rapides Somasegaran et Hoben, (1985). Un virage de la coloration violette ou jaune a été enregistré et cela est due à une acidification du milieu, les souches qui ont changé la couleur sont supposer des souches contaminantes et n'appartiennent pas ou *Rhizobia* (Grama, 2008).

La culture des isolats bactériens sur milieu GPA a été étudié, tous les isolats ce sont développer sur ce milieux lis peuvent donc utiliser le glucose comme une source de carbone (Chitra, 2013).

L'étude des caractères biochimique des isolats est indispensable à leur identification préliminaire, tous les isolats sont des oxydases positives, cinq souches seulement sont aérobiques ce sont donc les souches les plus susceptibles a êtres des *Rhizobium*. Les Rhizobiums sont des micro-organismes aérobie ou microaérophile et peuvent se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0.01 atm).

En ce qui concerne la réduction des nitrates en nitrites tous les isolats ont présentés cette propriété, le perfectionnement de la fixation de l'azote est du à la présence du nitrate réductase dans les bactéroïdes. D'ailleurs 97% de l'activité des nitrates réductase dans les nodules est localisé dans les bactéroïdes (Lucinski et *al.*, 2001).

Les micro organismes possèdent une uréase très active qui transforme l'urée en amoniaque et en carbonat d'amoniame ; c'est une transformation très importante dans le monde agricole (Mobey ;1992 et Guirand ,1998). L'activité de l'uréase est largement distribuée dans le sol et l'eau aquatique où elle joue le rôle essentielle dans le métabolisme d'azote des plantes ; algues quelques invertébrée des mycètes, ainsi que des procaryotes (Palinska et *al.*, 2000).

L'absence de la dégradation de la gélatine est aussi une caractéristique des rhizobia (Chitra, 2013).

La plus part des isolats ont été capable d'utiliser les différents types de sucres, le genre *Rhizobium* se caractérise par la capacité de la majorité des souches à utiliser le manitole, le glucose, l'arabinose, le fructose et le saccharose (Werner, 1992).

Les caractéristiques physiologiques des isolats ont été étudiées en se basant sur l'influence des facteurs abiotiques qui sont le pH, la température, et la salinité. Tous les isolats ont présentés une croissance aux pH testé ; 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12.

D'après les travaux de Benselama, (2015), la majorité des souches étudiées ont été capable de pousser à un pH compris entre 2 et 12 avec un optimum de croissance entre 6.5 et 7.5. Graham, (1999), a aussi rapporté que les rhizobias peuvent tolérés des pH allant de 4.5 à 9.

La culture des bactéries à pH acide entre 3 et 5 est rapporté par de nombreux travaux qui stipule que le PH cytoplasmique des souches tolérante à l'acidité est moins fortement affecté par l'acidité externe (Graham et *al.*, 1994).

La tolérance des rhizobia à un pH acide dépend de leur capacité de maintenir un pH intracellulaire enter 7.2 et 7.5, même à un pH aide externe. La composition est la structure de la membrane externe pourrait également être un facteur de tolérance de pH (Graham et *al.*, 1994).

Hungria et Vargas, (2000), ont notés que l'acidité du sol cause un problème important au cours de différentes étapes de la symbiose. Le microsymbiont est généralement le partenaire le plus sensible au pH, certains souches de Rhizobia peuvent tolérées l'acidité mieux que d'autre (Vargas et Graham, 1998). En sachant que l'acidité du milieu représente aussi un facteur important qui influe sur la survie des bactéries et leurs efficacités, il a été rapporté que la plus part des souches rhizobiale ne présente aucune croissance sur milieu hautement acide cela affecte aussi la formation des nodules ainsi que la fixation efficace de l'azote par les bactéries (Zahran, 1999). L'intérêt que présente ces bactéries résident d'une façon générale de leurs capacités a survivre dans la phase saprophytique et symbiotique dans un milieu acide (Souai.2010).

L'effet de la température a été étudié, afin de vérifier l'influence de cette dernière sur la croissance des isolats, d'après les résultats nous avons remarqué une croissance pour la majorité des isolats à 4°C, et à 35°C tous les isolats ont pu croître mais en fait et à mesure que la température augmente nous avons remarqué que certains isolats n'ont pas tolérés les températures élevées de 40°C, 45°C, et de 50°C.

Les températures très élevées des sols affectent la croissance des rhizobiums, en sachant que l'optimum de croissance de la majorité des souches se situe entre 25 °C et 30°C. Elle touche l'infection des poils au niveau des racines, la croissance et le développement des bactéroïdes, la structure des nodules, ainsi que leur fonctionnement (Zahran, 1999).

La plupart des souches rhizobiales ont la capacité de croître à une température de 4°C à 40 °C et ont montré une croissance optimale dans l'intervalle de 20 à 37 °C (Sbihi, 2008).

Gharzouli, (2006), a révélé la croissance des souches rhizobiales à des températures variant de, 37, 45, et 50°C. Le stress thermique non extrême induit généralement l'expression de protéines de stress thermique qui assure la protection des enzymes clés de la physiologie microbienne (Clautier et al., 1992). La température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol, l'influence de cette dernière sur la croissance est en fait une mesure de son effet sur la turgescence et sur l'action des enzymes de la cellule (Prévost et al., 1997). Les températures élevées engendrent la déshydratation de la voie métabolique des enzymes (Yong et al., 2011), par contre les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes (Hun et al., 2000). De même les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes nod et donc l'infection de la nodulation (Zhang et al., 1996).

La salinité est parmi les facteurs limitants de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Zahran, 1999),

Nous avons remarqué que les isolats ont présenté une croissance acceptable en présence de différents types de sels à différentes concentrations sauf quelques exceptions.

La détermination des concentrations inhibitrices pour les cinq sels testés montre une différence de degré de tolérance entre les souches issues à partir des plants de fève et les souches isolées à partir des plants de luzerne. Les souches de la luzerne sont plus tolérantes à la salinité (Mouafak, 2010). La sensibilité des souches de rhizobies à la salinité dépend

principalement de la composition chimique des sels. Le calcium (Ca) accompagné de chlore (CL), entraîne une forte toxicité dès la concentration de 0.1%, ce qui est contradictoire avec nos résultats ou tous les isolats on tolère le NaCl à ses différentes concentrations, Berraho et *al.*, (2003) ont constaté que les sols salins sélectionnent naturellement des souches plus tolérantes. Nos résultats concorde aussi avec les travaux de Brahade et *al.*, (1996), qui ont montré que les chlorures et sulfates avaient le même effet inhibiteur sur la croissance de *R. meliloti*, *R. phaseoli* et *R. leguminosarum* bv. *Vicia*.

L'inhibition de la croissance bactérienne par les sels, résulte de deux effets que peut présenter un stress salin, un effet ionique et un effet osmotique (Bohloul, 1982; Botsford, 1984). Dans le cas de l'effet ionique, l'influence des sels sur la croissance est due aux effets que peuvent représenter les ions Na, Ca, K, CL, SO₄ fortement représentés dans le milieu, sur le métabolisme des bactéries, ces ions à certains seuils inhibent de nombreuses fonctions métaboliques par interaction de ces ions avec les macromolécules notamment les protéines et les acides nucléiques dont la structure peut être affectée par l'excès d'ions (Yancey, 1994).

Par ailleurs, l'enrichissement du milieu et/ou le cytoplasme en ions peut provoquer un déséquilibre électrolytique induisant une perturbation de la dynamique des échanges entre la cellule et le milieu (Yancey, 1994; Natarajan et *al.*, 1996).

Cette sélectivité de la membrane plasmique qui permet aux cellules de défier en permanence les lois physiques de la diffusion est cependant à l'origine de la deuxième manifestation de la salinité, l'effet osmotique. Du fait de la relative imperméabilité de la cellule aux ions, leur présence dans le milieu se traduit par augmentation de l'osmolarité de ce dernier par apport au cytoplasme. Cette augmentation de l'osmolarité du milieu génère un déséquilibre osmotique entre le compartiment cellulaire et l'extérieur. Ce déséquilibre provoque une sortie d'eau et une perte de turgescence de la cellule. Il s'en suit une réduction du volume cytoplasmique qui peut atteindre un niveau qui n'est plus compatible avec la division cellulaire (Natarajan et *al.*, 1996).

La croissance et la survie d'une souche bactérienne en présence d'une osmolarité croissante du milieu extérieur, nécessitent une stratégie adaptative pour que la bactérie maintienne une pression osmotique intracellulaire supérieure à celle du milieu extracellulaire. La réponse des micro-organismes aux variations de pression osmotique (osmorégulation) se traduit généralement par une accumulation plus ou moins importante de solutés compatibles

ou molécules organiques, dont le transport à travers la membrane cytoplasmique nécessite des transporteurs spécifiques. Les principaux solutés compatibles rencontrés chez les bactéries sont certains acides aminés, les bétaines et divers glucides (Le Rudulier, 1993).

En ce qui concerne l'activité antifongique nous avons obtenue des résultats avec taux d'inhibition qui varie de 21% jusqu'à 70% exercer par les isolats bactérien vis-à-vis de trois champignons phytopathogène appartenant aux genres *Fusarium*, d'après nos résultats il est bien claire que l'effet des isolats sur la croissance des champignons est différents.

Les travaux de Lakhal, (2012) ont mis en évidence l'effet antagoniste de bactérie rhizobiale sur la croissance et le développement des champignons du genre *Fusarium*. L'action inhibitrice de certaine rhizobia peut être due à la sécrétion des substances antifongique ou bien par des antibiotique de nature protéique, ou bien tout simplement par compétition et c'est ce qui est rapporter par les travaux de (Essalmani et Lahlou, 2002 et Gangé et *al.*, 2009).

Le pouvoir de suppression des champignons est effectué par les capacités nutritionnelles que peut ces bactéries utiliser pour épuiser le milieu ce qui leurs permet de coloniser rapidement l'espace et de privé les autres champignons de croitre ce qui est bénéfique dans la lutte biologique (Lakhal, 2012).

Des métabolites antifongiques tels que les auxines, les gibbérellines, les sidérophores et les antibiotiques sont produites par le *Rhizobium*, interviennent dans le contrôle des maladies des plantes causé par les champignons pathogène (Lakhal et *al.*, 2003).

L'activité antifongique exercer par les Rhizobiums est du aussi à la sécrétion de lipopolysaccharides (LPS) qui représentent un facteur important de virulence, ce qui permet de sarmenter les mécanismes de défenses du pathogène, ainsi qu'ils jouent un rôle important dans la suppression du champignon qui est accompagné d'une perte intracellulaire de survie qui réduit ainsi fortement sa virulence (Lakhal, 2011).

Les travaux d'Abramovitz et *al.* (2004), ont distinguer que les LPS des rhizobias sont substance antifongique, Chakraborty et chakraborty (2006) ont rapportés aussi que le *Verticillium alboatrum* et le *Fusarium oxysporum* ont été inhibés respectivement par 7.6 et 7.8 % des isolats de rhizobiums grâce à leurs production de polysaccarides.

- **Conclusion**

Le développement de la bio-fertilisation et des bio-pesticides représentent un volet important à la protection des végétaux et de l'environnement par l'avantage qu'il n'influe ni sur l'homme ni sur l'écosystème dont il va être employée. De ce fait La recherche des micro organismes bénéfique et utile pour une utilisation saine a fait l'objet de plusieurs recherches (Adam, 2008).

Les bactéries appartenant au genre *Rhizobium* ont été largement étudié, leur aptitude a noduleés les racines des plantes et a réaliser avec ces derniers des relations symbiotiques qui ont un rôle important dans la croissance du végétale par la fixation de l'azote atmosphérique et le rendre utilisable pour la plante. Ces bactéries exercent aussi un effet sur la croissance des autres microorganismes qui sont néfaste pour les cultures, ils suppriment ces derniers par l'occupation de l'espace et l'épuisement des nutriments indispensables à leurs survie, en plus de la production de certains antibiotiques et des sidérophores qui ont un rôle important dans l'induction de la résistance systémique chez la plante et la promotion de sa croissance (Lakhal,2012).

L'objectif de notre étude c'est basé sur l'isolement et la caractérisation des bactéries rhizobiales à partir des racines de la luzerne cultivée *Medicago sativa* L. La caractérisation a été réalisée à travers plusieurs tests, morphologiques, physiologiques, biochimiques, et antifongiques.

Pour une identification préliminaire ces test nous ont permis de ce rapprocher à des isolats susceptible a être, des bactéries symbiotique fixatrice de l'azote, l'emploi de la galerie API 20 NE nous a nominer six souches pouvant appartenir au genre *Rhizobium* et cela a partir de leurs propriétés biochimiques.

Les isolats La8, La8', La6', La6, et La8/7, sont obtenues à la fin de ces tests.

Une activité inhibitrice de la croissance de certains champignons phytopathogène a été mise en évidence, les souches La8, La6, et La6' ont présentés une bonne activité antifongique vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* F. sp. *Lycopersici*.

A la lumière de ces résultats obtenus nous conseillant de refaire les tests précédents pour les isolats conservés et cela pour voir si les bactéries ont changé de comportement ou pas, si la différence obtenue d'après les tests n'est pas contradictoire

avec nos résultats obtenus une étude approfondie de la taxonomie de ces bactéries sera indispensable pour une meilleure identification, sans oublier de faire une caractérisation génétique et étudier leurs infectivité de la plante hôte la luzerne en plus que d'autres espèces de plantes légumineuses pour connaître la spécificité de cette relation symbiotique et de confirmé si ces isolats sont des Rhizobiums et si ils sont actifs ou pas.

Il faut garder les souches qui ont présentés un pouvoir antagonisme et les tester a la présence d'autres champignons phytopathogène *in vitro*, ainsi que leurs pouvoir de promotion de la croissance et la production de leurs métabolites.

- 1) **Benselama Amel.** 15/02/2015. Réhabilitation de la culture Lablab purpureus L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique. Thèse doctorat. Département de biotechnologie. Université d'Oran ES-Senia. Algérie. 2015.
- 2) **Gharzouli Razika.** 18/09/2006. Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. Mémoire de Magistère en Génétique Moléculaire. Département des Sciences de la Nature et de la vie. Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2006.
- 3) **Catherine Delmas.** 16 Avril 2009. Fiche technique : détermination du caractère GRAM + OU GRAM -. Laboratoire de Bactériologie Hygiène. Association déclarée à la Préfecture de la Haute-Garonne n° 8-543. CHU Toulouse.
- 4) **Elferiha Sihem.** 2009/2010. Influence de la salinité sur la formation des nodosités chez la fève (*Vicia faba* L.). Mémoire de Magistère en physiologie végétale. Département de biotechnologie. Université d'Oran. 2010.
- 5) **International Journal of Agricultural and Food Science.** 23 September 2013.
Isolation and Characterization of Rhizobium sp. form Root of Legume plant (*Pisum sativum*) and Its Antibacterial Activity against Different Bacterial strains. Universal Research Publications. 138-141
- 6) **Mouafek Ahlem.** 2010. La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. Mémoire de Magistère en Sciences Agronomiques. *Option* : Agriculture et environnement dans les régions arides Université Mohamed khider – Biskra –. Algérie. 2010.
- 7) **FAGHIRE Mustapha.** 30 Juin 2012. Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse doctorat en Biotechnologie et Bio-ingénierie de la Production Végétale. Spécialité : Agro-physiologie et Microbiologie des symbioses. Université Cadi Ayyad. Marrakech. 2012.

- 8) **Noura Ziadi.** 2007. Utilisation des engrais minéraux azotés en grandes cultures : description des différences formes et leurs impacts en agroenvironnements. CRAAQ- OAQ 2007
- 9) **Jacques Bejot.** 2015. Technique de coloration qui est la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. <file:///C:/Users/Sarah/AppData/Local/Temp/COLORATION%20DE%20GRAM%20-%20Encyclop%C3%A6dia%20Universalis.html>
- 10) **Philippe Gillet ; Luc Boel et Jan Jacobs.** Septembre 2009. Bacteriologie medicale tropicale. Institut de Médecine Tropicale. 2009.
- 11) **Fang-Lin Yang et Liang-Ping Lin.** 2 June 1998. Cytostructure, lipopolysaccharides, and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, Vol. 39, 1998.
- 12) **Adama Diouf.** 25 octobre 1997. caracterisation et utilisation de souches de *rhizobium* isolees du haricot vert (*phaseolus vulgaris* l.) dans la zone des niayes au senegal. Thèse de Doctorat. faculte des sciences et techniques département de biologie végétale. Université cheikh anta diop dakar (UCAD). 1997.
- 13) **Gauri¹, Ashok kumar Singh¹, Rajendra Prasad Bhatt, Shailja Pant, Manjinder Kaur Bedi¹ et Ashok Naglot.** 1 October 2011. Characterization of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum*. Journal of Agricultural Technology 2011 Vol. 7(6): 1705-1723.
- 14) **Çigdem k...k, Merih kivan et Engin kinaci.** 04.02.2005. Characterization of rhizobium sp. isolated from bean. turk j biol 30 (2006) 127-132
- 15) **Razika Gharzouli.** 27 Mai 2013. Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides produits par l'espèce *Rhizobium sllae*. Thèse de Doctorat en Génétique Moléculaire. Département de Biologie Animale. Université de Constantine 1. 2013.
- 16) **Guenoune Salima.** 10 / 05 / 2009. Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouch. Diplôme de Magister en Microbiologie

Appliquée. Département de Biochimie – Microbiologie. *Option* : Biotechnologies Microbiennes. Université Mentouri Constantine. 2009.

17) **Chitra Bhattacharya, Bhagyashree Deshpande et Bhawana Pandey**. 23 september 2013. Isolation and caractérisation of rhizobium sp. form root of legume plant (pisum sativum) and its antibacterial activity against different bacterial strains. international journal of agricultural and food science. Issn 2249-8516.

18) **Ousmane DIAGNE**. 1992. isolement e 1 caractérisation de souches de rhizobium de prosopis provenant de différentes zones écologiques. Institut Sénégalais de Recherches Agricoles. Ministère du développement r u r a l e t d e l'hydraulique.

19) **P. Somasegaran et H. J. Hoben**. May/1985. Méthods in légume-rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL. Project and MIRCEN.

20) **MAOUGAL Rym Tinhinen**. 2004. Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*) : Inoculation et nodulation. Mémoire de magister en biotechnologies végétales. Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine. 2004.

21) **Perry E. Olsen et Wendell A. Rice**. 1989. *Rhizobium* Strain Identification and Quantification in Commercial Inoculants by Immunoblot Analysis. Applied and environmental Microbiology. 1989.

22) **Faghire Mustapha**. 30 Juin 2012. Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse Doctorat. Biotechnologie et Bio-ingénierie de la Production Végétale Spécialité : Agro-physiologie et Microbiologie des symbioses. Université Cadi Ayyad. 2012.

23)

<file:///C:/Users/Sarah/Downloads/Documents%20svt%20%201%C3%A9gumineuses%20et%20rhysobium.html> 01/11/2014 légumineuses et rhysobium. génétique et évolution-diversification du vivant.

- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.
- Sprent J.I., 1995.** Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. Soil Biol. Biochem 27(4/5): 401-407.
- Sprent J.I., 1999.** Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics 2/2: 149-162.
- Raven P. H., Evert R. F., Eichlorn S. E., 2000.** Biologie végétale. 6^{ème} Edition de boeck , Paris.
- Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A., Stevens P., 2001.** Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.
- Lévêque C., Mounoulou J.C., 2001.** Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.
- Guignard J.L., Dupont F., 2005.** Botanique. 13^{ème} Edition Masson.
- Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D., Luczak C., 2004.** Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. 3^{ème} Edition Dunod, Paris.
- Dénarié J.,** Texte de la 8^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- Caratini R., 1984.** Les plantes. Bordas, Paris.
- Cronk Q., Ojeda I., Pennington R.T., 2006.** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Current Opinion in plant biology 9: 99-103.
- Baudoin J-P., 2001.** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 5(4): 221-230.
- Babo B V., 2002.** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Université Laval, Québec.

I. Milieux de culture

1. YMA

Mannitol	10.0g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	1000ml
PH	6.8
Agar	15g

2. PDA

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1L

3. GPA

Glucose	5 g
Peptone	10 g

5. CR

Rouge de Congo	0.25g
Ethanol	100 ml
10 ml de solution/ 1litre YMA	

6. BCP

Pourpre de Bromocresol	1g
Ethanol	100 ml
10 ml de solution / 1 litre GPA	