

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

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

*Université Dr. MOULAY TAHAR-Saida-*



Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme

Master en biologie

**Spécialité : Biotechnologie végétale**



**Thème**

---

Isolement, Purification, Identification de microorganisme  
symbiotique de *Médicago minima* en vue de la production d'engrais  
biologique

---

**Présenté par : -Melle HOCINE Ibtissem Chahrazed**

**-KOURAT Sarah**

**Soutenu le : 14/10/2015**

**Devant le jury, composée par :**

**Président : Mr Ammam A.**

**Maitre assistant**

**Encadreur : Mme FARES S. Maitre assistant**

**Examineur : Mme BenaAbdesslem Y**

**Maitre assistant**

**Année Universitaire 2014 – 2015**

## Remerciement

*Avant tout nous remercions Allah le tout puissant, de nous guider toutes nos années d'études et nous avoir données la volonté, la patience et le courage pour terminer notre travail.*

*Nos remerciements seront adresser à tous qui ont servir à réaliser ce travail et plus particulièrement à :*

*A notre promotrice F.A.R.E.S. S qui nous encadrés pour réaliser ce projet.*

*Nous lui reconnaisse son entière disponibilité, son aide inestimable et ses conseils sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir.*

*Aux membres jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

*A monsieur A.M.M.A.M. A qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse. Nos respectueux hommages.*

*A madame H.A.C.H.E.M. Y pour m'avoir fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse. Toute notre gratitude*

*Mes professeurs d'Université Dr Moulay Taher Mr H.A.C.H.E.M.K, Mr L.A.R.F.B et vice doyen Mr K.A.F.D*

*A Nos chères amies qui nous ont donné de leur temps et effort.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance et de respect A :*

*Très mon cher père et très ma chère mère symbole d'amour et de tendresse, qui est tant privée pour me satisfaire, pour leurs sacrifices.*

*Mes adorables sœurs. Wissem Hind, Rekaia, Fatima, Nawel, Hezia, Amina.*

*Marwa, Rania, Inès.*

*Mes frères Abderrahim, Elhocine, Lahcen, Mohamed, Abdelkrim, Bilal, Youcef*

*A mes Oncles Ahmed, Laaradj et Aneur, Mckhtar, Maheddine, Djamel,*

*Houari.*

*A Tantes Maseouda Mckhtaria, Houaria,*

*A toute la famille Hocine et Smaili; chacun par son nom.*

*A mes sœurs Sara, Fatima, Oumelkheir, Assia, Nadjet, Imane, Karima, Ikram, Maseouda, Latifa, Khadidja.*

*A mes amis Kamel, Cheik, Abdelkadeur, Yacine, Lahcen, Nabil.*

*A mon professeur vice doyen M's Kaid, a tous mes professeurs de biotechnologie végétal et biologie.*

*Mes collègues de la promotion biologie, a mes contacts de près ou loin.*

*Et tous mes amis*

*Abtissem Chahrazed*

## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit : Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mon frère abdelkarim et mes sœurs Houria et Khadidja qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Mes amis Ibtissem Chahrazed, Hanane, Oumelkheir, Amina, Nadjet, Fatima, Imane, Amira, Ghania, Scumia, Scumia, Imane, Manar, Ikram, Khadidja, Amel. Et les garçons : Abdelkarim, Abdelkarim, Wahid, Abdelkader, Chikh, Yacine, Lahcen, Nabil.*

*Mes professeurs d'Université Dr Moulay Taher et vice doyen Mr Kaïed*

*A toute ma famille Kourat et mes contacts*

*Sarah*

# Table de matière

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>I .Revue bibliographique</b>	
I .Les symbioses fixatrices d'azote.....	03
I.1 Les symbioses <i>Rhizobiums</i> -légumineuses .....	03
I.2 Les partenaires de la symbiose Rhizobienne .....	04
I.2.1 partenaire végétal .....	04
I.2.1.1 Généralité sur légumineuses .....	04
I .2.1.2 Données sur <i>Medicago minima</i> .....	04
I .2.1.2.1Morphologie de <i>Medicago minima</i> .....	04
I .2.1.2.2 Position systématique .....	05
I.2.2 partenaire bactérien .....	06
I.2.2.1 Généralité sur les <i>Rhizobiums</i> .....	06
I.2.2.2 Classification actuelle des <i>Rhizobiums</i> .....	06
I.3 Etablissement de la symbiose .....	08
I.3.1 La formation des nodules .....	09
I.3.1.1 Stade de Pré-infection .....	09
I.3.1.2 Stade de l'infection .....	09
I.3.1.3 Développement du nodule .....	10
I.4 Application biotechnologique des <i>Rhizobiums</i> .....	11
I.4.1 Production d'inoculum <i>Rhizobiums</i> .....	11
I.4.2 Les différents types d'inoculum .....	12
I.4.3 Condition d'inoculation .....	12
<b>II. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>14</b>
II.1 Matériels biologique .....	14
II.1.1. Sol .....	14
II.1.2 Matériel végétal .....	14

II.1.2.1 <i>Medicago Minima</i> .....	14
II.1.2.2 Provenance des graines .....	15
II.2 Méthodes .....	15
II.2.1 Choix du site de prélèvement .....	15
II.2.2 Analyse de sol .....	16
• Détermination de l'humidité .....	16
• Détermination de la conductivité électrique .....	17
• Détermination du potentielle d'hydrogène (pH) .....	17
II.2.3 Prélèvement des plantes in-nature .....	18
II.3 Isolement des bactéries à partir des nodules récoltées in-nature.....	18
II.3.1 Collecte des nodules .....	18
II.3.2 La conservation des nodules par déshydratation .....	19
II.3.2.1 Isolement et purification des isolats bactériens .....	19
II.3.2.1.1 Stérilisation des nodules .....	19
II.3.2.1.2 Isolement selon la méthode du nodule écrasé .....	20
II.3.2.1.3 Purification des isolats .....	20
• Vérification de la pureté des souches .....	20
• Coloration de Gram .....	21
II.3.2.1.4 Conservation des souches .....	22
II.3.3 Examen de la mobilité des isolats .....	23
II.3.4 Etude de la croissance bactérienne .....	24
II.3.5 Effet de la température sur la croissance bactérienne .....	24
II.4 Test de nodulation .....	24
II.4.1 Stérilisation, germination et mise en culture des plantules de <i>Medicago minima</i> .....	24
II.4.2 Culture des plantes.....	25
II.4.3 Inoculation .....	25

II.4.4 Estimation de la croissance des plantes in-vitro et Observation du phénotype des plantes inoculées .....	26
---	----

### **III. Résultats et Discussion .....28**

III.1 présentation de la zone d'étude .....	28
III.1.1 Caractéristiques de la zone d'étude .....	28
III.1.2 Analyse de sol .....	29
III.2 Isolement des rhizobiums .....	30
III.2.1 Constitution d'une collection de souches .....	30
III.2.2 Etude de la diversité des isolats .....	31
III.2.2.1 Caractéristiques morphologiques .....	31
III.2.2.1.1 Caractéristiques macroscopiques .....	31
III.2.2.1.2 Caractéristiques microscopiques .....	32
III.2.2.1.3 Test de mobilité des isolats .....	33
III.2.2.2 Conservation des souches .....	34
III.2.2.3 Croissance bactérienne .....	35
• Aspect des cultures sur YEM liquide .....	35
• Cinétique de croissance .....	35
III.2.2.4 Effet de la température sur la croissance des isolats bactérien ...	37
III.3 Etude des inoculations des plantes in- vitro .....	38
III.3.1 Test de nodulation .....	38
III.3.2 Estimation du test de nodulation in-vitro.....	39
III.3.2.1 Germination de graines .....	39
III.3.2.2 Résultats du test de nodulation .....	40
III.3.2.3 Observation du phénotype des plantes .....	42

### **IV. Conclusion.....43**

#### **Référence bibliographique**

<b>Liste des tableaux</b>		
<b>N=° de tableau</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>N=° de page</b>
<b>01</b>	Classification des Rhizobia	<b>07</b>
<b>02</b>	Normes de la salinité du sol	<b>17</b>
<b>03</b>	Détermination de l'humidité, pH et conductivité.	<b>29</b>
<b>04</b>	isolats bactériens obtenus à partir de nodules récoltés dans la région semi-aride (Maamora, Saida).	<b>30</b>
<b>05</b>	Caractéristiques macroscopiques des cultures des souches autochtones isolées de <i>Medicago minima</i> .	<b>32</b>
<b>06</b>	résultat issue après utilisation de milieu Mannitol de mobilité et après incubation à 28°C.	<b>34</b>
<b>07</b>	effet des diverses températures sur la croissance des isolats.	<b>37</b>
<b>08</b>	Résultat du test de nodulation de <i>Medicago minima</i> (nombre de nodule).	<b>41</b>
<b>09</b>	Résultats du test de nodulation de <i>Medicago minima</i> testées avec les isolats bactériens.	<b>43</b>
<b>10</b>	détermination du nombre caractéristique relatif.	<b>44</b>
<b>11</b>	nombre le plus probable de bactéries (dilutions de 5 en 5. Quatre plantes inoculées avec 1ml)	

<b>Liste des figures</b>		
<b>N=° de figure</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>N=° de page</b>
<b>01</b>	Morphologie de <i>Medicago minima</i>	<b>05</b>
<b>02</b>	processus d'infection de la racine et mise en place d'un nodule	<b>08</b>
<b>03</b>	échange des signaux entre les deux partenaires.	<b>09</b>
<b>04</b>	plante de <i>Medicago minima</i> récoltée in-nature.	<b>14</b>
<b>05</b>	échantillon de graines de <i>Medicago minima</i>	<b>15</b>
<b>06</b>	collecte des nodules in-nature et après rinçage des racines et nodules	<b>18</b>
<b>07</b>	conservation des nodules à longue durée	<b>19</b>
<b>08</b>	Ensemencement par la Technique de quatre cardant	<b>21</b>
<b>09</b>	La conservation des isolats pour une courte et longue durée (A) : conservation à courte durée. (B) : conservation de longue durée.	<b>22</b>
<b>10</b>	Technique de la pique à l'aide d'une pipette pasteur	<b>23</b>

<b>11</b>	incubation des tubes avec Agitation pendant 24h	<b>24</b>
<b>12</b>	Schéma descriptive de la technique de préparation des suspensions bactériennes (milieu YEM) pour inoculation des plantules in-vitro (test de nodulation).	<b>26</b>
<b>13</b>	Schéma descriptive de la technique de préparation des différentes dilutions utilisées pour le dénombrement des rhizobiums dans le sol par la technique d'infection des plants.	<b>27</b>
<b>14</b>	Fig 14 : Situation géographique de la Wilaya de Saïda (Maamora).	<b>28</b>
<b>15</b>	Aspect macroscopique des colonies de Rhizobia après sa culture sur milieu YEM à 28°C	<b>31</b>
<b>16</b>	aspect microscopiques des isolats après coloration de gram (GX100)	<b>33</b>
<b>17</b>	les souches sont conservées dans milieu YEM solide	<b>37</b>
<b>18</b>	croissance bactérienne des isolats bactériens de Medicago minima (Maamora).	<b>36</b>
<b>19</b>	Observation macroscopique des résultats de test de température de Medicago minima.	<b>38</b>
<b>20</b>	Germination des graines de Medicago minima sur eau gélosée.	<b>39</b>
<b>21</b>	La chambre de la mise en place des plantules pour le test de nodulation	<b>41</b>
<b>22</b>	Croissance in-vitro des plantes de Medicago minima inoculées avec des isolats bactériens et témoin non inoculée	<b>42</b>
<b>23</b>	Croissance in-vitro des plantes de Medicago minima inoculées par des dilutions de sol.	<b>44</b>

## Liste des abréviations

**A.C.T.A** : L'association de Coordination Technique Agricole

**B.N.L** : Bactéries Nodulant les Légumineuses

cm : centimètre

Ce : conductivité 2lectrique

**D.O** : Densité Optique

**F.O.A** : Foods Agriculture Organisation

g: gramme

H : Humidité

HgCl<sub>2</sub> : Chlorure mercurique

I : indice d'aridité

**J.C** : Jésus Christ

Log : Logarithme

Medic : Medicago

°C : Degrésiliceuse

m: mètre

M: Medicago

ml: milliliter

µl: Microlitre

nm: nanometer

mS/cm: Millisiemens par centimètre

P : précipitation moyenne annuelle

P : poids avant séchage

P : poids après séchage

pH : Potentielle d'hydrogène

T : température moyenne annuelle

**YEM** : Yeastextracts mannitol

v/v : Volume par volume

% : pour cent

## **Résumé :**

En méditerranée, exactement en Algérie le rendement des cultures est faible, sont souvent expliqués par les conditions pluviométriques défavorables et les éléments nutritifs sont pauvres.

A cause des conditions précédents en allons créer des recherches scientifiques qui préconise des stratégies basés sur l'utilisation des engrais biologiques. Dans notre recherche nous visons à soutenir des souches de *Rhizobia* des zones semi-aride et la constitution d'une souche de bactéries provenant de la luzerne naine à Saida.

Au commencement, de notre étude les 6 souches ont été écrasées et isolées par méthode des striés les nodules des racines de *Medicago minima* de région Maamora dans sud-est de Saida. Et à partir de plusieurs répétition de purification des isolats. Les bactéries sont caractérisés par examens macroscopiques et microscopiques donne une explication comparable à celle des *Rhizobiums*. Nous avons contrôlé la croissance bactérienne de chaque souche à fin déterminé le temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle.

Nous avons testé les 6 souches à différentes températures pour confirmer quelles sont les températures idéales et les plus résistantes.

En fin, explique sur le test nodulation à partir les 6 souches de *Rhizobiums* et *Medicago minima* les résultats obtenus que les souches sélectionnées ne forment pas les nodules.

Mots clés : *Medicago minima*, *Rhizobium*, zone semi-aride, nodulation, les éléments nutritifs, engrais biologiques.

Summary :

In the Mediterranean, just as Algeria crop yield is low, often explained by unfavorable rainfall conditions and nutrients are poor.

Because of the previous conditions will created scientific research that advocates strategies based on the use of organic fertilizers. In our research we aim to support the *Rhizobia* strains semi-arid areas and the creation of a strain of bacteria from the alfalfa dwarf in Saida.

In the beginning of our study 6 strains were crushed and isolated by method of striated root nodules of *Medicago minima* of région Maamora in southeast of Saida. And apartir of several repeat purification of isolates. Bacteria are characterized by macroscopic examination and explanation microscopiquesdonne comparable to that of *Rhizobia*. We controlled bacterial growth at the end of each strain determined the time to reach the exponential phase.

We tested six strains at different temperatures to confirm what températures idéals and most resistible.

In the end, says the nodulation test from 6 strains of *Rhizobia* and *Medicago minima* results select strains that do not form nodules.

Keywords: *Medicago minima*, *Rhizobium*, semi-arid zone, nodulation, nutrients, organic fertilizers.

## Introduction:

L'utilisation de fertilisants chimiques au niveau mondial a augmenté de façon alarmante. Il y a encore un demi-siècle, les agriculteurs appliquaient 17 Tg (1012g) de fertilisant chimique par hectare, mais aujourd'hui, ce volume a été multiplié par huit (FAO, 2005).

Par ailleurs, Les engrais chimiques permettent d'obtenir un plus grand rendement agricole, mais sont responsables d'une pollution massive des sols et de l'eau. Les nitrates et phosphates notamment, présents dans les engrais chimiques, atteignent les cours d'eau et les nappes phréatiques par infiltration. De plus Une synthèse des instituts américains de la santé suggèrent que les concentrations élevées de nitrates dans l'eau de boisson sont en partie responsable de pathologies y compris de cancers. La solution de lutter contre les pollutions générées par les engrais chimiques est le développement de l'agriculture biologique au détriment de l'agriculture intensive.

L'agriculture biologique est système d'agriculture qui s'inscrit pleinement dans une démarche de développement durable. C'est un système de gestion de la production agricole qui n'utilise aucun engrais chimique, pesticide, produit industriel de synthèse ou organisme génétiquement modifié (<http://www.vedura.fr/economie/agriculture/agriculture-biologique>, 2008). Néanmoins, nous pensons qu'il est préférable que les travaux de recherche devraient accompagner l'expansion de la production des produits sains pour la santé des sols et des animaux et donc pour celle de l'espèce humaine.

En présence d'un champ d'étude aussi vaste que méconnu, nous attirons l'attention sur la famille botanique des fabacées ou légumineuses. Ces légumineuses sont considérées depuis longtemps comme pionnières des sols pauvres en minéraux notamment en azote, grâce à leur symbiose avec des bactéries du sol fixatrices d'azote appelées rhizobiums ou bactéries nodulants les légumineuses « BNL » (Zakhia, Jederet *al.*, 2004).

Cette symbiose se traduit par la formation d'un organe ou nodule à l'intérieur duquel des rhizobiums réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante.

Cette association où la légumineuse devient ainsi indispensable à la fertilisation azotée, joue un rôle important à la fois écologique et économique et où la symbiose *rhizobia-légumineuse* contribue à l'enrichissement des sols en azote.

La fixation symbiotique de l'azote contribue à plus de 100 Millions de Tonnes d'azote par an (Graham, 1998), l'atmosphère constituant ainsi la principale source d'azote (Haynes, 1986).

La capacité de la fixation symbiotique de l'azote des légumineuses peut être améliorée en inoculant le sol avec des souches performantes de rhizobia. Des techniques de sélection ont permis de mettre sur le marché de nombreuses souches utilisables pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses (Dakora, 1985)

Pour qu'une légumineuse soit capable de fixer abondamment l'azote, elle doit être bien nodulée par des rhizobiums spécifiques et efficaces. L'abondance de ceux-ci dans un sol dépend de son histoire (nature des légumineuses spontanées et cultivées les années précédentes) et de ses caractéristiques physicochimiques.

La réponse des légumineuses à l'inoculation avec les rhizobia peut être affectée par plusieurs facteurs (dont principalement les populations bactériennes indigène). Les souches introduites doivent supporter une compétition avec les souches locales pour occuper les sites de nodulation sur les racines des légumineuses, car les souches locales sont bien adaptées à leur environnement et occupent plus les sites de nodulation comparativement aux souches introduites qui doivent supporter en plus la pression parasitaire (Bado 2002).

Pour cela l'objectif de notre travail est :

- manipuler les concepts de base et même avoir une certaine connaissance pratique en permettant de faire une collection de souches de *Rhisobiums* d'Algérie et la constitution d'un soucier de bactérie associer au *Medicago minima*.
- l'enrichissement de la collection de souches de *Rhisobiums* d'Algérie dans les zones semi-arides, la région de SAIDA.

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- Isolement, purification et caractérisation des souches à partir des nodules de *Medicago minima*.
- La confirmation de l'infektivité des souches avec le partenaire végétal *Medicago minima* par test de nodulation *in-vitro*.
- L'estimation du nombre des *Rhisobiums* dans le sol de notre zone d'étude par technique d'infection des plantes *in-vitro*.

## **I .Les symbioses fixatrices d'azote :**

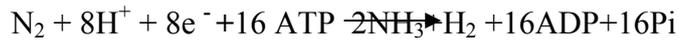
L'azote est essentiel à la croissance des végétaux, notamment pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Présent en abondance sur Terre (78 % de l'atmosphère), toutes les formes de l'azote ne sont cependant pas assimilables par les végétaux (Stacey G et al, 2006). En effet, pour être utilisable par les végétaux, l'azote doit être sous forme minérale ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ ), ce qui peut se réaliser par deux voies : la voie de la fixation biologique et la voie industrielle de synthèse des engrais azotés. La fixation biologique de l'azote ( $\text{N}_2$ ) s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre certaines plantes et les *Rhizobiums*,

Parmi toutes les plantes capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote, les légumineuses sont celles qui présentent le plus grand intérêt écologique et agronomique et font l'objet de nombreuses recherches (Jasmine SAUVION et al ; 2013).

### **I.1 Les symbioses *Rhizobiums* -légumineuses :**

Dans le monde végétal, les légumineuses, plantes de la famille botanique des *Fabacées*, ont la capacité unique de mettre en place une symbiose avec certaines bactéries présentes naturellement dans le sol (Voisin et al, 2002a), par la formation de structures différenciées et spécialisées, appelées nodules ou nodosités, localisées le plus souvent au niveau des racines et dans certains cas au niveau des tiges (Dreyfus et al., 1988). A l'intérieur du nodule, les *Rhizobiums* se différencient en bactéroïdes, forme sous laquelle ils fixent l'azote de l'air présent dans leur environnement et le convertissent en une forme intermédiaire, l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_3$ ), grâce à une enzyme bactérienne spécifique, la nitrogénase. Cette symbiose naturelle permet à la plante d'utiliser directement l'azote de l'air environnant pour sa croissance.

La symbiose est à bénéfices réciproques : la bactérie fournit à la plante le N fixé ; en retour, la plante apporte l'énergie nécessaire à la synthèse des nodosités et à leur fonctionnement. De ce fait, la fixation d'azote atmosphérique a un coût en carbone à l'échelle de la plante. Au sein des nodosités, du carbone est en effet utilisé pour la production de substrats énergétiques et de squelettes carbonés impliqués dans la synthèse et la maintenance des tissus des nodosités, ainsi que pour leur activité fixatrice de  $\text{N}_2$  et pour l'exportation de composés organiques azotés hors des nodosités. Les assimilats carbonés nécessaires, issus de la photosynthèse, sont fournis aux nodosités aux dépens des autres organes, principalement les racines, et dans une moindre mesure également aux dépens des parties aériennes (Voisin et al, 2002a). La création de fixation de  $\text{N}_2$  est catalysée par un complexe enzymatique appelée nitrogénase (Dixon et Wheeler, 1986) et la suivante :



## **I.2 Les partenaires de la symbiose *Rhizobienne* :**

### **I.2.1 partenaire végétal :**

#### **I.2.1.1 Généralité sur légumineuses :**

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

#### **I .2.1.2 Données sur *Medicago minima* :**

La luzerne naine est originaire de la région de la Méditerranée jusqu'en Asie mineure (Vít Bojnanský, Agáta Fargašová, 2007), Cette minuscule luzerne fait partie des plantes ignorées et piétinées par de nombreuses personnes. Actuellement, sa répartition s'est développée dans presque toute l'Europe ; Asie occidentale et Afrique septentrionale ([www.tela-botanica.org](http://www.tela-botanica.org); 2000). Pour l'Algérie s'est une espèce rare qui se trouve juste dans le tell algéro-constantinois et nommée « Nefla » et aussi « Aska » (Quezel et Santa, 1962).

#### **I .2.1.2.1 Morphologie de *Medicago minima* :**

*Medicago minima* ou la Luzerne naine, est une espèce de plantes herbacées de la famille des *Fabacées*. une Plante annuelle de 5-40 cm, étalée ou dressée, toute pubescente-blanchâtre folioles petites, obovales ou oblongues en coin, denticulées au sommet, non tachées stipules entières ou peu dentées fleurs jaunes, petites 3-4 mm , 1-5 sur des pédoncules courts, aristés, égalant à peine la feuille pédicelles plus courts que le tube du calice ailes plus courtes que la carène gousse pubescente petite, globuleuse, à 3-5 tours de spire peu visibles, ainsi que les faces, à bords étroits obtus, hérissés d'épines nombreuses, rapprochées, dressées, fines, un peu crochues à la pointe graines oblongues en rein ([www.tela-botanica.org](http://www.tela-botanica.org); 2000)., (fig 01).



**Fig01** : Morphologie de *Medicagominima*(source : FloreAlpes)

**I .2.1.2.2 Position systématique :**(Small et Jomphe, 1989)

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Spermatophytes</i>
Sous- embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Dicotylédones</i>
Sous- classe :	<i>Rosidées</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille :	<i>Faboideae</i>
Tribus :	<i>Trifolieae</i>
Genre :	<i>Medicago (L.)</i>
Espèce :	<i>Medicago minima L</i>

## **I.2.2 partenaire bactérien :**

### **I.2.2.1 Généralité sur les *Rhizobiums* :**

Le partenaire bactérien de cette symbiose, appartenant à la famille des *Rhizobiacées* les *Rhizobiums*, ce terme a été utilisé en premier pour désigner ces bactéries formant des nodules sur les légumineuses. Du grec, “ Rhizo ” = racine et “ bium ” = vivant. Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses ou BNL (Bactéries Nodulantes des Légumineuses) sont des bactéries strictement aérobies, de formes bâtonnets et de Gram négatives, non sporulées, d'une largeur variant entre 0,5 et 0,9 µm et une longueur comprise entre 1,2 et 3 µm (Jordan, 1984). Elles sont mobiles par un seul flagelle polaire (cas de *Mesorhizobium*) ou par deux à six flagelles péritriches (JORDAN, 1984 ; SOMASEGARAN et HOBEN, 1994). Et puis les caractères biochimiques des *Rhizobiums* sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés (Somasegaran et Hoben, 1994). Et des 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). Phylogénétiquement, les BNL font partie de la subdivision alpha des proteobactéries (Stackebrandt et al., 1988) ou beta des proteobactéries (Moulin et al., 2001).

### **I.2.2.2 Classification actuelle des *Rhizobiums* :**

La combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques a permis de modifier considérablement la taxonomie des *Rhizobia* ces dernières années. Le tableau 01 présente la diversité des *Rhizobias* identifiés à partir de cette nouvelle approche en 2006.

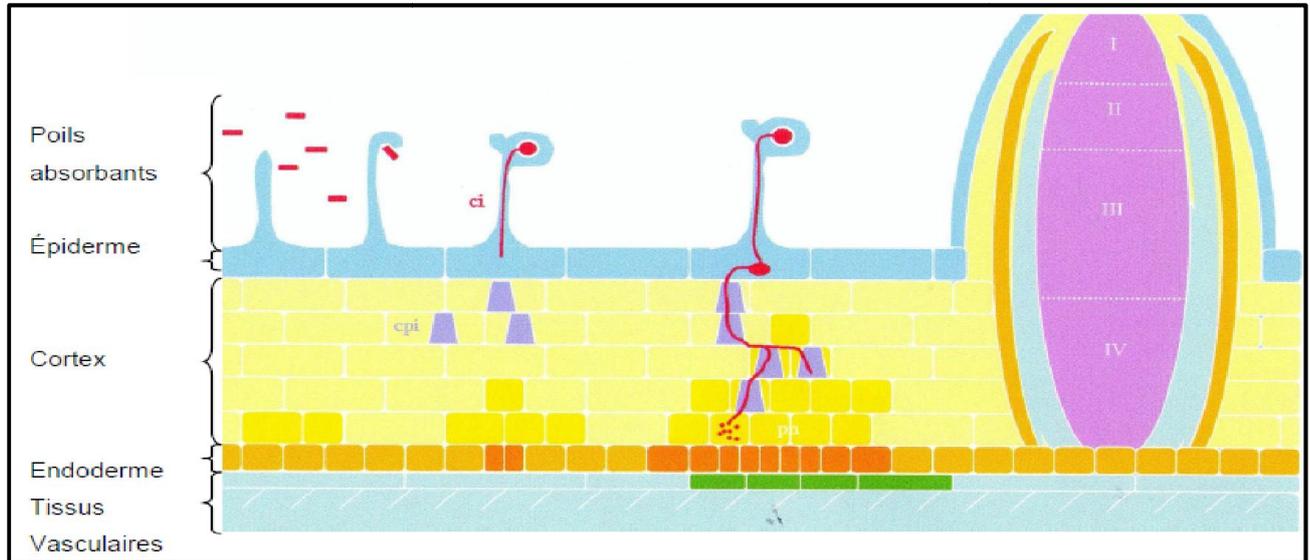
**Tableau 01:** Classification des *Rhizobia* (D'après NOEL, 2009)

Protéobactéries		Espèces		
Division	Genre	Nombre	Représentatives	Hôtes représentatives
<b>Alpha</b>	<i>Rhizobium</i>	16	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Psivum, Trifolium</i> etc.
			<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i>
			<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, leucaena</i>
	<i>Bradrhizobium</i>	7	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine, Vigna</i>
			<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i>
	<i>Sinorhizobium</i> ( <i>Ensifer</i> )	11	<i>S. eliloti</i>	<i>Medicago</i>
			<i>S. fredii</i>	<i>Glycine, Vigna</i>
	<i>Azorhizobium</i>	2	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>Mesorhizobium</i>	11	<i>M. loti</i>	<i>Lotus spp.</i>
	( <i>Allorhizobium</i> )	1	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia</i>
<i>Methylobacterium</i>	1	<i>M. Nodulans</i>	<i>CrotalariaSpp.</i>	
<i>Devosia</i>	1	<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia</i>	
<i>Ochrobacterium</i>	1	<i>O. lupinus</i>	<i>Lupinus</i>	
<i>Phyllobacterium</i>	1	<i>P. lupinii</i>	<i>Trifolium etLupinus</i>	
<b>Beta</b>	<i>Burkholderia</i>	5	<i>B. phymatum</i>	<i>Mimosa</i>
	<i>Cupriavidus</i> ( <i>Ralstonia</i> )	2	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i>

Au total, 59 espèces de *Rhizobia* réparties en 12 genres et appartenant aux sous-classes alpha (10 genres) et beta (2 genres) des Protéobactéries ont été identifiées depuis 2006 (NOEL, 2009). Ces espèces se répartissent également en huit familles (*Rhizobiacées*, *Phyllobacteriacées*, *Bradyrhizobiacées*, *Hyphomicrobiacées*, *Methylobactériacées*, *Brucellacées*, *Burkholderiacées* et *Ralstoniacées*) et deux ordres, à savoir les *Rhizobiales* et les *Burkholderiales*. L'ordre des *Rhizobiales* renferme les six premières familles.

### I.3 Etablissement de la symbiose :

L'établissement de l'association mutualiste entre la bactérie et les racines de la plante hôte se caractérise par la formation des nodules et se déroule en trois phases (A), (B) et (C) voire la figure 02 suivante :



**Fig 02** : processus d'infection de la racine et mise en place d'un nodule.

Les *Rhizobiums* (rh) attirés par la présence des racines de l'hôte, adhèrent et se développent à la surface racinaire. La capture des bactéries au sein du recourbement d'un poil absorbant permet la formation d'un cordon d'infection (ci) qui véhicule les bactéries dans la racine en traversant les cellules qui s'y sont préparées en mettant en place un cordon de pré-infection (cpi). La production par les *Rhizobiums* de facteurs Nod, associée au déroulement du processus infectieux, induit l'activation du programme d'organogénèse qui débute par la mise en place d'un primordium nodulaire (pn) où sont relarguées les bactéries. Ce processus aboutit à la formation d'une nodosité fixatrice d'azote mature, qui présente quatre zones spécifiques : le méristème (I), la zone d'infection (II), la zone de fixation (III) et la zone de sénescence (IV). (D'après Timmers et al, 1999).

#### I.3.1 La formation des nodules :

##### I.3.1.1 Stade de Pré-infection :

La mise en place de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse résulte d'un processus complexe faisant intervenir une première étape au cours de laquelle les deux organismes échangent pour se reconnaître des signaux moléculaires (Stacey G et al, 2006). La plante produit au niveau de ses racines des composés (riches en flavonoïdes), qui sont perçus par les

*Rhizobia* présents dans le sol. Ces composés vont déclencher la production bactérienne de signaux appelés facteurs Nod (pour Nodulation) voire la figure 03. (Dénarié J et al, 1996). Ces facteurs Nod sont à leur tour reconnus par les poils absorbants des racines de la plante hôte, ce qui induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte ; La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures ; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crose de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui enferme les *Rhizobiums* (Wais et col, 2002).

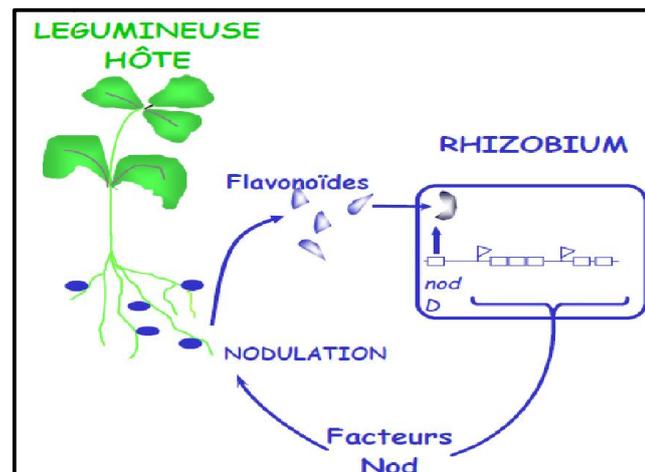


Fig 03 :échange des signaux entre les deux partenaires.

### I.3.1.2 Stade de l'infection :

Le processus infectieux dans la racine correspond à l'ensemble des événements qui sont associés à la pénétration des bactéries dans les cellules de la racine et leur progression vers le nodule en formation. Deux types d'infection peuvent être distingués : soit elle débute entre les jonctions intercellulaires crack-entry, soit elle débute par voies intracellulaires (pour revue voir Gage, 2004 ; Patriarcaet al., 2004 ; Brewin, 2004).

La première étape de l'infection consiste en l'attachement des aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisé à la surface des cellules de *Rhizobia*. Ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Krishnan et Bannett, 2007).

La phase d'adhésion entraîne une rétractation des racines en réponse à une sécrétion de molécules et la bactérie pénètre dans les cellules par un mécanisme d'invagination. La croissance et le déplacement de la bactérie dans la racine entraînent la formation d'une excroissance ou filament infectieux (ou cordon d'infection) (Panagiota et al., 1995; Gage,

2004). Simultanément à la mise en place de ce cordon, les cellules du cortex se divisent et forment un primordium nodulaire.

Une fois toutes ces structures en place, les bactéries entrent dans la racine, cheminent le long du cordon d'infection jusqu'au niveau du primordium nodulaire, sont relarguées dans le cytoplasme des cellules du primordium où elles sont enfermées dans une structure appelée symbiosome. Au sein du symbiosome, les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique (Stracke S et al, 2002).

### **I.3.1.3 Développement du nodule :**

Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués suivant la persistance ou non du méristème. Les nodules de types indéterminés, sont initiés à partir des cellules du cortex interne et ont un méristème apical persistant qui produit en continue de nouvelles cellules. Les nodules matures sont alors allongés et organisés en zones histologiquement différentes. Les nodules de types déterminés, sont initiés à partir du cortex externe et ont un méristème transitoire. Les nodules matures sont sphériques et toutes les cellules du tissu central sont globalement au même stade de différenciation (Brewin, 1991 ; Foucher et Kondorosi, 2000).

Le nodule croît grâce à l'action du méristème, les cordons d'infection se ramifient davantage de façon isotrope (Monahan-Giovanelli *et al.*, 2006) et pénètrent une partie des cellules situées en dessous du méristème. Ainsi, le jeune nodule est formé d'un méristème apical et d'un tissu central composé de cellules infectées.

Dans le cas des nodules indéterminés, l'activité persistante du méristème conduit au développement d'un organe allongé dont la partie centrale est subdivisée en cinq zones qui se différencient successivement de l'apex (distal à la racine) vers la base (proximale à la racine) voire la figure suivante :

- **La zone I** :cette zone correspond au méristème apical et assure la production continue de nouvelles cellules ainsi que la croissance du nodule. Les cellules de cette zone sont petites, riches en cytoplasme et ne contiennent ni bactéries, ni cordons d'infection. Ces cellules se différencient et forment la zone II, dite d'infection.

- **La zone II, dite d'infection** :Dans cette zone les cordons d'infection sont très ramifiés et pénètrent dans une partie des cellules distales où les bactéries sont libérées

(Pichon *et al.*, 1992). Les cellules plus proximales de la zone II sont le site de la co-différenciation bactérienne et végétale menant à l'état fixateur d'azote.

- **La zone III, dite de fixation** : les cellules infectées, très grandes sont caractérisées par une vacuole centrale et un large cytoplasme envahi de bactéroïdes allongés et fixateurs d'azote atmosphérique (Ottet *et al.*, 2005). Entre les zones d'infection et de fixation, quelques assises cellulaires riches en amyloplastés forment l'interzone II-III.

- **La zone IV, proximale à la zone III** : correspond à la zone de sénescence dans laquelle les cellules des deux symbiotes dégénèrent (Vasse *et al.*, 1990).

- **La zone V** : est une dernière zone, qui n'est visible que chez les nodules de plus de 6 semaines, est caractérisée par une nouvelle libération de bactéries, issues des cordons d'infection, dans les cellules végétales nécrosées issues de la zone IV. Cependant dans ce cas, les bactéries ne se différencient pas, ne fixent pas d'azote, mais ne provoquent pas non plus de réactions de défense, c'est pourquoi elles sont dites saprophytes (Timmers *et al.*, 2000).

## **I.4 Application biotechnologique des *Rhizobiums* :**

### **I.4.1 Production d'inoculum *Rhizobiums* :**

L'inoculation des légumineuses avec des bactéries symbiotiques est une pratique qui est bien établie. Il s'agit de l'introduction dans le sol d'une souche de *Rhizobium* spécifique, sélectionnée, pour son efficacité symbiotique et son pouvoir compétitif pour la nodulation.

L'inoculation assure donc la présence d'un grand nombre de *Rhizobium* (Sanginga *et al.*, 1994 ; Date, 2000) qui favorisera l'infection des racines, la nodulation et conséquemment la fixation de l'azote atmosphérique (Dufresne, 2004).

L'utilisation de souches de rhizobiums à partir de nodules prélevés sur des légumineuses locales est la méthode la plus efficace pour constituer une collection pour la production d'inoculum (Cleyet - Marel, 1988).

### **I.4.2 Les différents types d'inoculum :**

Il existe de nombreux inoculums commerciaux qui se rapprochent des principaux types suivants (Bashan, 1998) :

• **L'inoculation solide** : est le plus utilisé pour l'inoculation des légumineuses (Beck, Materon et al., 1993).

• **La tourbe** : de la plupart des formes d'inoculums disponibles, celle de la tourbe est la forme la plus populaire : elle n'est pas difficile à obtenir et à produire et elle maintient une grande concentration de bactéries viables. (Graham-Weiss, Bennett et al., 1987).

- **La vermiculite** : sa nature non organique fait qu'elle est facilement stérilisée sans risque de production de toxines ou causer de nouveaux changements structuraux.

La structure multi-lamellaire de la vermiculite fournit une aération supérieure et de l'espace pour une prolifération microbienne (Graham-Weiss, Bennett et al., 1987).

Ce support a été choisi car, microbiologiquement pur (contient  $> 10^9$  de *Rhizobium* par gramme et délivre  $> 10^5$  rhizobia par graine) et possède une grande propriété à couvrir les graines (Graham-Weiss, Bennett et al., 1987).

- **Inoculation liquide** : Afin de développer un alternatif à l'inoculum à base de tourbe, les recherches se sont concentrées sur l'inoculum liquide car l'inoculum à base trouble est trop encombrant pour une application en champ sur une large échelle et tend à boucher les semoirs (Singleton, Keyser et al, 2002).

### I.4.3 Condition d'inoculation :

Avant de procéder à l'inoculation, il est nécessaire de vérifier les points suivants:

- **Qualité de l'inoculum** : la viabilité de la souche, sa spécificité par rapport à la plante hôte et sa compétitivité.

- **Les caractéristiques symbiotique de plante hôte** (spécificité et potentiel fixateur d'azote) : plus la plante est spécifique et a un potentiel fixateur d'azote atmosphérique élevé, plus sa réponse à l'inoculation sera marquée.

- **Propriété du sol** : de nombreuses caractéristiques édaphiques peuvent être joué le rôle de facteur limitant, ce sont en particulier : L'acidité ou alcalinité du sol, excès d'azote combiné, propriétés physiques défectueuses (aridités ou engorgements), (toxicité : salinité, toxicité manganique ou aluminique), présences des *Rhizobiums* natifs dans le sol, présences des microorganismes antagonistes des *Rhizobiums*, présence de micro-organismes pathogènes. (Brunket *al.* 1991).

#### **I.4.4 Conservation et emploi de l'inoculum :**

L'inoculum est un produit biologique vivant qui ne peut être stocké et utilisé comme engrais inerte, il est nécessaire de prendre donc certaines précautions pour sa conservation et son emploi :

La conservation de l'inoculum doit se faire à 4°C et la température ne doit jamais dépasser 30°C (Obaton, 1989 ; Daza et al, 2000 ; Brick, 2002 ; Maougal, 2004).

Au moment de l'inoculation il est recommandé de travailler dans un local frais, à l'abri du soleil. Le matériel utilisé doit être propre.

Dans tous les cas, bien lire l'étiquette qui précise le mode d'emploi de l'inoculum, et la date limite d'utilisation (Montange et Beunard, 1984).

#### **I.4.5 Les techniques d'inoculation :**

Selon les auteurs consultés, on distingue deux modes d'inoculation (Brokwell, 1982) :

- l'inoculation directe : les graines sont mises sur les graines avant le semis
- l'inoculation indirecte : les *Rhizobiums* sont disposées dans la raie de semis (microgranulés, inoculum liquide).

## II. Matériels et Méthodes :

Notre travail à été effectué au niveau du laboratoire de biologie au sein de l'université Docteur Tahar Moulay Saida.

### II.1 Matériels biologique :

#### II.1.1. Sol :

Les échantillons de sols ont été collectés sur un site localisée dans une zone semi-aride de l'Ouest Algérien (Saida) Maamora. A partir du sol entourant le pied de la *Medicago minima*, nous avons prélevés des échantillons à différentes profondeurs respectivement 20, 40, et 60 cm.

#### II.1.2 Matériel végétal :

##### II.1.2.1 *Medicago Minima* :

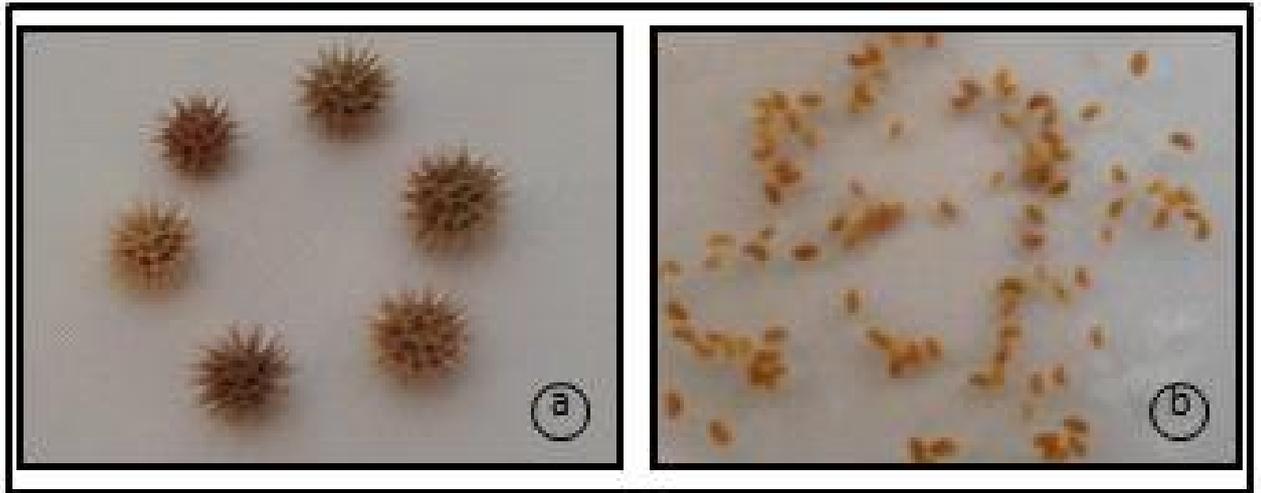
La plante de *Médicago Minima* récoltée à partir de Mamoura le 05/03/2015 pour faire l'isolement de rhizobiums spécifiques de cette plante (Fig04)



**Fig04** : plante de *Medicago minima* récoltée *in-nature*.

### II.1.2.2 Provenance des graines :

Les graines de *Medicago.Minima* proviennent d'une collection de l'année de la même région d'El-Maamoura, au cours de l'année 2012 pour la création d'une collection de graine des plantes spontanées locales (Saida) et qu'on a laissé dans leurs gousse jusqu'au début de notre travail. (Fig 05).



**Fig05** : échantillon de graines de *Medicago minima*

(a : les gousses, b : les graines)

## II.2 Méthodes :

### II.2.1 Choix du site de prélèvement :

- Nous avons choisi un site d'une région semi-aride (Saïda) dans le but de constituer une collection de souches d'une région semi-aride de la willaya de Saida.
- Le prélèvement a été effectué le 05/03/2015 pour la plante *Medicago Minima* pour l'isolement des Rhizobiums au laboratoire.

### II.2.2 Analyse de sol :

Nous avons obtenu des échantillons correspondant au site du sol sur lesquels nous avons réalisé les différents traitements :

- Réception – identification ;
- Réduction des mottes ;
- Tamisage (avec pesée du refus si nécessaire) sur tamis 2mm. (CIRAD, 2004)
- Stockage dans un sachet dans le réfrigérateur à 4°C en vue de leur conservation puis

Préparation pour les différentes analyses à faire.

- **Détermination de l'humidité :**

Les échantillons sont séchés à l'étuve à 105°C ± 5°C jusqu'à masse constante. Une nuit, soit environ 15 heures, suffit généralement. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial. (CIRAD, 2004).

Après séchage le poids de la terre séchée permet de connaître l'humidité relative du sol en % du la terre séchée :

$$H = (P - P') / P' \times 100 \text{ (Dominique 2005)}$$

H : Humidité.

P : Poids avant séchage.

P' : Poids après séchage.

- **Détermination de la conductivité électrique (Ce) :**

La salinité du sol peut être déterminée par la conductivité électrique d'une solution aqueuse de sol. La conductivité électrique E<sub>Ce</sub> (Electrical Conductivity of the extract) avec l'unité de decisiemens/mètre (dS/m) ou millimhos/centimètre (mmhos/cm) est l'expression des ions et cations dans le sol. Le degré de la salinité des sols est donc mesuré par la conductivité et évalué selon les normes internationales présentées dans le tableau (02).

Elle a été déterminée par le conductimètre sur une suspension avec un rapport de sol/eau de 1/5 à une température de 25°C comme préconisé par Dominique (2005).

Tableau 02 : Normes de la salinité du sol

Salinité (ECe : mS/cm)	Salinité du sol	Réponses des plantes
0 à 2	Non salé	Pas l'impact sur la croissance des plantes
2 à 4	Légèrement salé	La croissance des plantes sensibles peut être réduite
4 à 8	Moyennement salé	La croissance de plusieurs plantes est réduite
8 à 16	Salé	Bonne croissance des plantes tolérantes au sel.
> 16	Très salé	Bonne croissance des plantes très tolérantes au sel.

$1\text{S/m}=10^4 \mu\text{S/cm}=10\text{mS/cm}=10^3\text{mS/m}$  (normalisation française, afnor, 1986)

- **Détermination du potentielle d'hydrogène (pH) :**

C'est un facteur qui influe directement sur l'absorption des éléments nutritifs. Elle s'effectue à l'aide d'un pH mètre (Hanna instrument) à électrodes et réalisée sur une suspension de sol dans un rapport Volume/Volume de 5.

### II.2.3 Prélèvement des plantes *in-nature* :

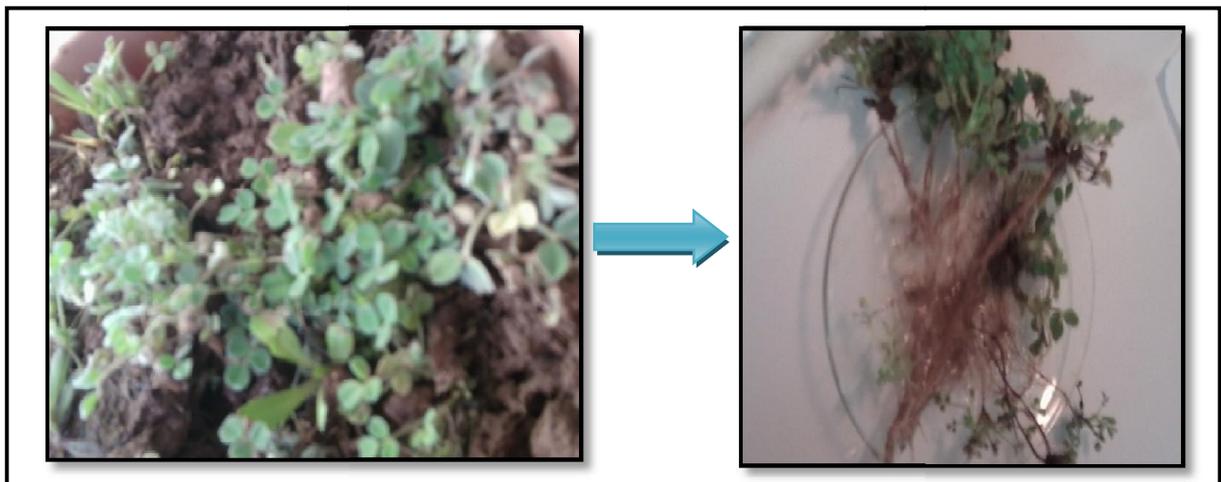
Les plantes sont déterrées très soigneusement avec une bêche, nous avons creusé environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire ; et où se trouvent en général la majorité des nodosités, retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ; comme recommandé par les auteurs, puis les racines prélevées sont conservées dans des sachets pour être transportées au laboratoire pour l'éventuel isolement futures.

## II.3 Isolement des bactéries à partir des nodules récoltées *in-nature*

### II.3.1 Collecte des nodules :

La collecte des nodules est faite à partir de *Médicago minima* récolté *in-nature* ; la collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran(1994) **Somasegaran P., Hoben H.J.** 1994. Handbook for Rhizobia :Methods in legume-Rhizobia technology .P.450.Springer-Verlag.new York.Qui consiste à:

- ✓ Creuser à environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire
- ✓ Essayer d'enlever soigneusement le sol lié au niveau des racines en faisant attention à ne pas abimer les nodules
- ✓ Placer délicatement la plante dans un sachet de plastique et les transporter immédiatement au laboratoire
- ✓ Laver délicatement au laboratoire les racines et les nodules sous l'eau courante
- ✓ Détacher les nodules à 1 – 2 mm du site d'attache, les racines, puis les sécher avec du papier filtre.
- ✓ Une partie des nodosités a été utilisée directement pour l'isolement ; l'autre a subi une conservation. (fig 06)



**Fig 06** : collecte des nodules *in-nature* et après rinçage des racines et nodules

### II.3.2 La conservation des nodules par déshydratation :

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

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est recommandée, la conservation des nodules a été réalisée par déshydratation dans des flacons en verre contenant du CaCl<sub>2</sub> (Fig 07). Le flacon en verre est rempli au deux tiers de son volume par du CaCl<sub>2</sub>. Les nodules ont été par la suite déposés entre deux couches de coton Vincent, J.M (1970) A Manual for the Practical Study of Root -Nodule Bacteria. I.B.P. Hambook N°15, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 164 (en anglais et en espagnol).

Chaque flacon est identifié et portera :

- ✓ Lenom de la plante hôte
- ✓ Le lieu et la date de prise de l'échantillon.

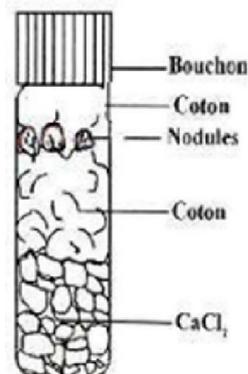


Fig 07 : conservation des nodules à longue durée

#### II.3.2.1 Isolement et purification des isolats bactériens :

Les nodules fraîchement lavés sont détachés de la racine à l'aide d'une pince et utilisés directement alors que ceux qui seront conservés par dessiccation sont réhydratés durant une nuit au réfrigérateur dans l'eau distillée, puis laissés pendant une heure à température ambiante (Vincent, 1970 ; Somasegaran, 1994).

##### II.3.2.1.1 Stérilisation des nodules :

Les nodules sont immergés pendant 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95<sup>0</sup>/<sub>0</sub> puis transférés immédiatement dans du chlorure de mercure(HgCL<sub>2</sub>) acidifié à 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (Annexe 1). Pendant 3 minutes. La stérilisation est laissée dans un flacon d'eau distillée, toujours, pendant une heure après le dernier rinçage (Vincent, 1970). Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

### **II.3.2.1.2 Isolement selon la méthode du nodule écrasé :**

L'isolement est réalisé selon la technique de Vincent(1970).une nodosité désinfectée est ensuite écrasée aseptiquement à l'aide d'une flambée à l'alcool dans une boîte de pétri contenant le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol), et incubation à 28<sup>0</sup>C (Annexe 1).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quadrantsdemanière à isoler des simples colonies. Les boîtes de pétri sont incubées pendant 24 à 48heures à 28<sup>0</sup>C.

YEM (Yeast Extract Mannitol) est le milieu utilisé pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par liter d'eau distillé (Annexe1). Le milieu de culture doit contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries. L'autoclavage de milieu se fait à 120<sup>0</sup>C pendant 20 minutes.

### **II.3.2.1.3 Purification des isolats :**

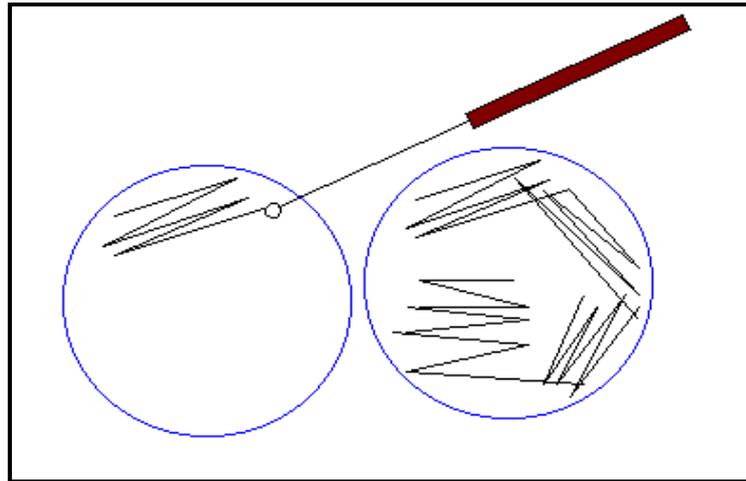
Après identification des isolats selon les caractères morphologique par culture sur les milieux YEM(Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben,1994) ; des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des colonies bien isolées, l'aspect macroscopique (couleur, forme, diamètre, contour, et viscosité) et l'aspect microscopique après coloration de Gram sont notés.la méthodes consiste à repiquée sur milieu YEM gélosé et incubée à 28<sup>0</sup>C pendant 72heures.

- **Vérification de la pureté des souches :**

La pureté des souches est vérifiée par épuisement jusqu'à l'obtention de colonies isolées. Il est conseillé d'observer les colonies à l'aide d'une loupe binoculaire afin de vérifier leur pureté après épuisement (Ensemencement est réalisé selon la technique de quatre cardant de manière à isolé des simples colonies) (Fig 08). Donc la pureté des isolats est confirmée par observation macroscopique et

observation microscopique après coloration de Gram ce qui permet aussi de vérifier l'homogénéité des cellules.

L'aspect macroscopique des colonies (couleurs, forme, contour et viscosité) ainsi que l'aspect microscopique des isolats et leur Gram ont été notés.



**Fig 08 :** Ensemencement par la Technique de quatre cardant (Vincent 1970).

- **Coloration de Gram :**

Un contrôle supplémentaire par la coloration de Gram permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif (comme les *Rhizobia*) et les autres bactéries à Gram positif.

La coloration de Gram doit son nom au médecin danois Hans Christian Gram qui mit au point de protocole en 1884 (Microsoft ®Encarta ® 2006©.1993-2005 Microsoft Corporation. Tous Droits Réservés).

Les étapes du protocole sont les suivantes :

- les cellules sont fixées à la flamme.
- Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une à deux minutes.les bactéries se colorent alors en violet.
- fixer le colorant à l'aide du Lugol pendant 30 secondes.
- Rincer à l'eau distillée afin d'évacuer l'excès de colorant.
- Décolorer par l'éthanol 95% pendant 5 secondes.

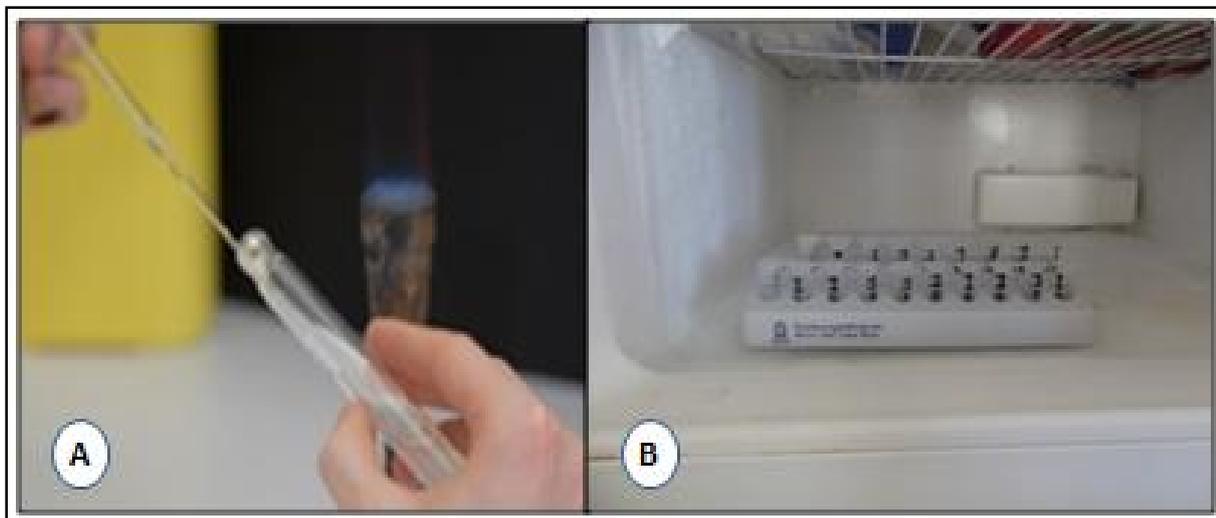
- Rincer de nouveau abondamment à l'eau distillée
- Recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 à 2 minutes.
- Rincer à l'eau distillée
- Sécher à température ambiante.
- Observation microscopique au grossissement (x 100) avec l'huile à immersion permet de voir si les cellules sont colorées en violet (Gram positif) ou bien en rose (Gram négatif)

### II.3.2.1.4 Conservation des souches :

Les isolats purifiés sont conservés selon les deux procédés suivants :

✓ Pour une courte durée, nous les repiquons sur le milieu YEM incliné, en effectuant des stries réguliers sur la surface de leurs gélose (fig 09) après 48 heures à 5 jour d'incubation selon les isolats, les tubes sont ensuite conservés au réfrigérateur à 4°C A raison de plusieurs exemplaires par souche selon la méthode de (Vincent, 1970).des repiquage réguliers sont réalisée tous les 6 mois

✓ Pour une conservation de langue durée (jusqu'à 2 ans), les cultures d'isolats ont été transférées dans des tubes Eppendorfs contenant 0,500 ml glycérol à 60% (Annexe) additionné de 0,500 ml de suspension bactérienne de *rhizobium* en phase exponentiel (v/v) le mélange homogénéisé et conservé à -12°C. dans des conditions optimales, une conservation à - 80°C est recommandée.

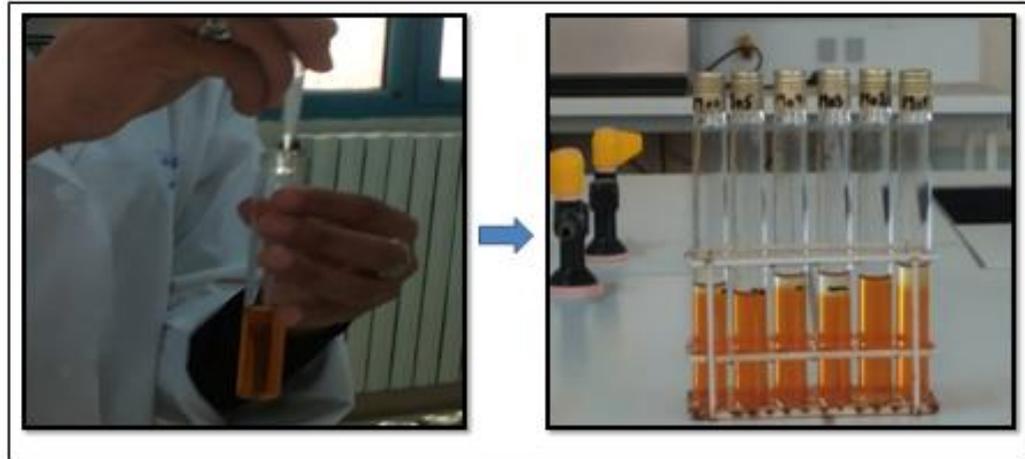


**Fig 09** :Laconservation des isolats pour une courte et longue durée

(A : conservation à courte durée.B : conservation de langue durée).

### II.3.3Examen de la mobilité des isolats :

Par une pipette Pasteur contient une suspension bactérienne de 24 heure faire une piqure centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incubé pendant 24h et observé. (fig 10)



**Fig 10** : Technique de la pique à l'aide d'une pipette pasteur

### **II.3.4 Etude de la croissance bactérienne :**

Selon Pelmont, (1995) La lumière absorbée ou réfléchiée par une suspension bactérienne est proportionnelle à la concentration des cellules de la culture. Les mesures de l'intensité du rayon réfléchi ou le pourcentage de la lumière absorbée par la suspension bactérienne, indique la densité optique qui permet de déterminer l'évolution du nombre de cellules présentes. Pour de telles déterminations, l'utilisation d'un spectrophotomètre permet de mesurer la turbidimétrie. On exprime ces valeurs sous forme de densité optique.

Nous avons préparé une pré-culture des différents isolats dans un milieu YEM liquide, 50 $\mu$ l du milieu de pré-culture renferment  $8.10^8$  bactéries/ml (le standard de turbidité de Mc Farland, (Annexe) a servi pour l'inoculation dans des tubes à vis contenant 5ml de milieu YEM liquide d'un ordre de 30 tubes pour chaque isolats (souche) Les tubes ainsi inoculés sont placés dans une étuve à 28°C sous agitation (fig 11) d'une façon permettant de mesurer la D.O. des trois tubes de la même souche à la fois chaque 3 heures pendant 24h à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm , la moyenne des trois lectures représente la D.O. de la souche, l'ensemble des lectures sont notées dans un courbe par rapport au temps.



**Fig 11** :incubation des tubes avec Agitation pendant 24h

### **II.3.5 Effet de la température sur la croissance bactérienne :**

Afin de déterminer la tolérance de nos souches à différentes températures, nous avons testé leur croissance des différentes souches à 4<sup>0</sup>C, 28<sup>0</sup>C, 37<sup>0</sup>C, 45<sup>0</sup>C sur le milieu YEM liquide et gélosé.

### **II.4 Test de nodulation :**

Les isolats extraits des nodosités de *Medicago minima* ne peuvent être identifiés comme *Rhizobium* après avoir effectué le test de nodulation, qui montre leur capacité à former des nodosités sur leur plante hôte, en condition bactériologique contrôlée. Pour réaliser ce test les étapes suivantes ont été effectuées :

#### **II.4.1 Stérilisation, germination et mise en culture des plantules de *Medicago minima* :**

Dans notre travail nous avons préféré la méthode qui consiste à désinfecter la surface des graines avec l'hypochlorite de sodium à 12<sup>0</sup>C pendant 5 minutes qui nous paraît plus ou moins efficace en l'absence d'autres produits de désinfection et la nous avons utilisée. Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toutes traces d'hypochlorite. Les graines ont été immergées dans la dernière eau de rinçage pour leur effectuer sous hotte à flux laminaire.

Les graines ainsi traitées ont été mises à germer aseptiquement dans l'eau gélosée à 1% dans des boîtes de pétri et incubées à l'obscurité, à température ambiante.

Après germination, les plantules sont cultivées dans des tubes de Gibson (de 18cm longueur, 2cm diamètre et une capacité de 35ml) contenant une solution nutritive dépourvue d'azote (Annexe 1), comme préconisé par Rigaut et Puppo (1975).

#### **II.4.2 Culture des plantes :**

Après germination de 3 à 5 jours, les jeunes plantes sont transférées dans des tubes Gibson (Gibson, A.H., (1980) Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In : methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation .Bergersen F .J .ed., John Wiley and Sons, New York, USA, pp : 139-184) et placées dans une chambre de culture en conditions de lumière à 200lux pendant 14 heures par jour à température ambiante.

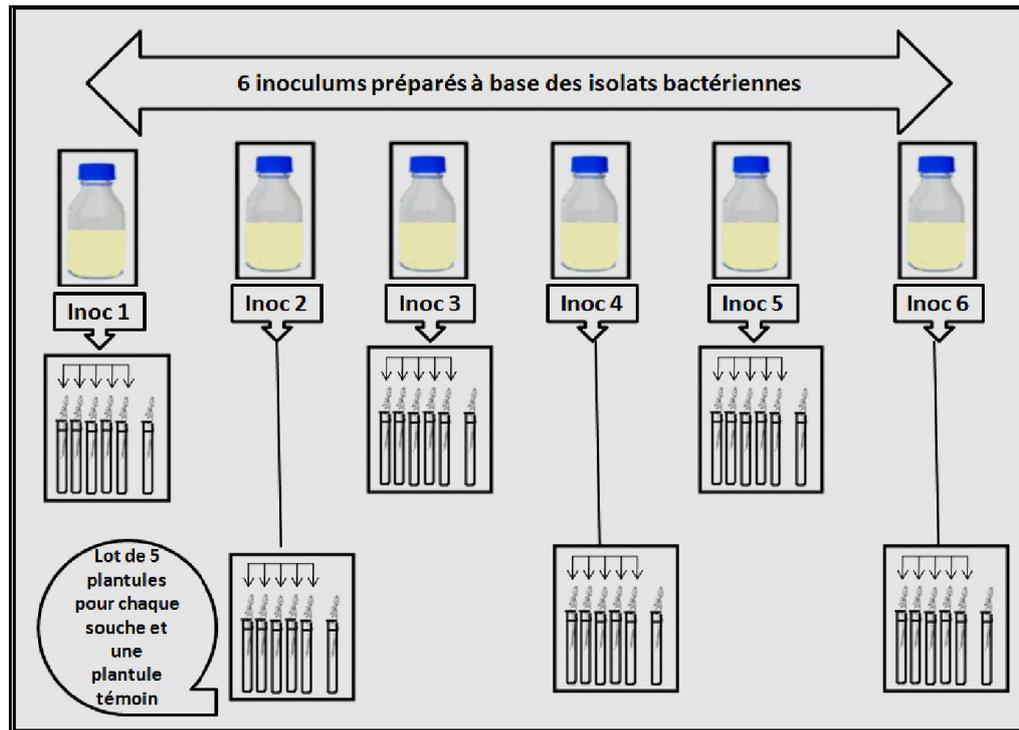
Les racines ont été maintenues à l'obscurité dans une boîte en carton trouée permettant l'introduction de la moitié inférieure des tubes.

Préparation des tubes Gibson : les tubes sont remplis de solution nutritive dépourvu d'azote, bouchés par du papier aluminium puis stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C.

#### **II.4.3 Inoculation :**

L'inoculation des plantes est réalisée 48 heures après la mise en place des plantes dans les tubes par 1ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, en effectuant cinq répétitions par souche et chaque essai comprend un témoin négatif non inoculé. La préparation de l'inoculation a été effectuée à partir de la suspension bactérienne d'une culture sur gélose vers le milieu liquide (fig.12). Nous avons comparés et évalués par le standard de turbidité de Mc Farland 1 (avec approximative correspondante à  $3.10^8$  bactéries/ml)

La compensation de la quantité d'eau perdue se fait avec de l'eau distillée stérile en alternance avec la solution nutritive (fig.12)



**Fig 12 :** Schéma descriptive de la technique de préparation des suspensions bactériennes (milieu YEM) pour inoculation des plantules *in-vitro* (test de nodulation).

#### II.4.4 Estimation de la croissance des plantes *in-vitro* et Observation du Phénotype des plantes inoculées :

L'observation de la couleur verte des plantes inoculées, de leur croissance (partie racinaires et aériennes) en comparaison aux plantes non inoculées (témoin) dans les mêmes conditions de culture. Et nous avons prélevée la plantule délicatement, et à l'aide d'un couteau nous avons détachés les nodosités pour compter le nombre de nodules de chaque plantule et déterminer leur couleur et leur forme.

### III. Résultats et Discussion :

#### III.1 présentation de la zone d'étude :

##### III.1.1 Caractéristiques de la zone d'étude :

Le prélèvement a été effectué au niveau de Maamora une commune qui se trouve au l'Est de la wilaya de Saida, La wilaya de Saida zone localisée à l'Ouest de l'Algérie sur un site correspondant à une zone semi-aride, Elle s'étend sur une superficie d'environ 6613 Km<sup>2</sup>. Le territoire de la wilaya est limité comme suit :

- Au nord, par la wilaya de Mascara.
- Au sud, par la wilaya d'El-Bayad.
- A l'Est, par la wilaya de Tiaret.
- A l'Ouest, par la wilaya de Sidi-Bel-Abbès.



Fig 14 : Situation géographique de la Wilaya de Saïda (Maamora).

### III.1.2 Analyse de sol :

Les analyses et tous notre travail ont été effectués au niveau du laboratoire de l'université de Saida, faculté des sciences et des technologies département de biologie. Les résultats des analyses de sol de surface et de profondeur de notre site de prélèvement sont consignés dans le tableau 03 :

**Tableau 03:** Détermination de l'humidité, pH et conductivité.

Région /mesure	H (%)	PH	Conductivité (ms/cm)
Maamora (Saida)	<b>12,85</b>	<b>7,28</b>	<b>2,50</b>

#### ✓ L'humidité :

Un excès d'humidité ou une sécheresse prolongée affecte négativement la nodulation et la fixation azotée (Gunasekaran et Balachandar., 2000). Venkateswaralu (1997) a rapporté que la population *Rhizobienne* dans le sol est très faible en saison sèche mais qu'elle retourne à la normale dès les premières pluies.

Une baisse de l'humidité du sol, même passagère, près du point de flétrissement suffit pour arrêter la croissance de façon durable et orienter la morphogénèse racinaire vers la croissance secondaire (en épaisseur). (Raimbault, 2003).

L'humidité de notre sol est 12.85% et c'est un taux obtenu au cour de saison tempérée ce qui explique la forme ramifier des racines de notre plante *MédicagoSp.* adaptée à la sécheresse.

#### ✓ Le pH :

Le résultat de la mesure du pH du sol enregistré est de 7.28, résultat compris entre 6.75 et 7.5. Et d'après Ollier et Foirée (1986) notre prélèvement a été effectué dans un sol neutre.

D'après Somasegaran et Hoben (1994) nos résultats justifient la présence des nodules car le pH optimal Pour les *Rhizobia* est variable entre 5.8 et 7.2 en fonction des espèces de *Rhizobium*.

Le processus de fixation de l'azote est influencé par le pH du sol qui affecte les deux partenaires de la symbiose, en général un pH de 6.0 à 7.0 fournit un environnement optimal à l'assimilation pour les légumineuses (Gunasekaran et Balachandar., 2000).

### ✓ La conductivité

La conductivité électrique des extraits de sol par l'eau est utilisée comme diagnostic de la salinité des sols.

La résultat analytique du sol présenté dans le tableau(03), montrent que notre sol est caractérisé par salinité légère ( $CE=2.5 \text{ ms/cm}$ ) Selon les normes français réalisées par l'afnor (tableau 01), donc le sol représente un sol un peu salé et bien sur a un effet sur la croissance de plante et en peut considéré notre *MedicagoSp* comme une plante non sensible au sels, car La salinité des sols a un effet négatif à la fois sur le rhizobium, sur la légumineuse hôte et sur la relation symbiotique (Singleton, 1982).

L'effet néfaste du sel est essentiellement dû à l'augmentation de l'osmolarité du milieu environnant la bactérie, cette osmolarité entraine un efflux d'eau entraînant une diminution du volume du cytoplasme. Cette plasmolyse affecte le métabolisme de la cellule et le fonctionnement des macromolécules et finalement conduit à l'arrêt de la croissance (le rudulier, 2005).

### III.2 Isolement des rhizobiums :

#### III.2.1 Constitution d'une collection de souches :

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires récoltés *in naturanous* a permis d'obtenir une collection de 06 isolats issus de *Medicago Minima* de site localisés dans une zone semi-arides de l'Ouest Algérien (Maamora, w Saida) : (tableau04)

**Tableau 04** : isolats bactériens obtenus à partir de nodules récoltés dans la région semi-aride (Maamora, Saida).

Souches	Origine géographique	Plante d'isolement	Date d'isolement
M01	Maamora	<i>Medicago minima</i>	05/03/2015
M02	Maamora	<i>Medicago minima</i>	05/032015
M03	Maamora	<i>Medicago minima</i>	05/03/2015
M04	Maamora	<i>Medicago minima</i>	05/03/2015
M05	Maamora	<i>Medicago minima</i>	05/03/2015
M06	Maamora	<i>Medicago minima</i>	05/03/2015

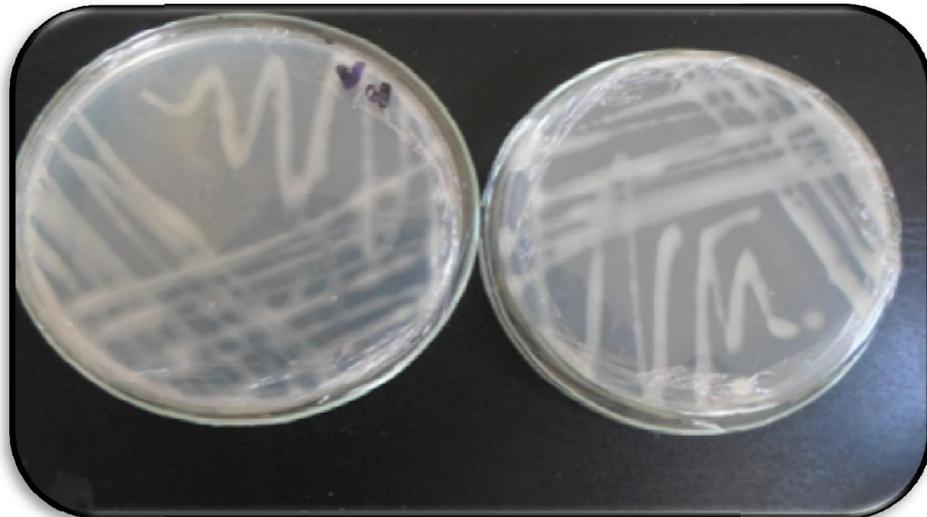
### III.2.1 Etude de la diversité des isolats :

#### III.2.1.1 Caractéristiques morphologiques :

##### III.2.1.1.1 Caractéristiques macroscopiques :

La plupart des souches purifiées présentent les caractéristiques morphologiques de *Rhizobia* (dommergues et Mangenot, 1970). Elles forment sur milieu YEM gélosé des colonies homogènes circulaires de 1 à 3 mm de diamètre, à contour régulier, de surface lisse, bombée, brillante d'une couleur blanchâtre à centre opaque pour toutes les souches de la région semi-aride .

La croissance sur milieu YEM solide chez la plupart des souches a été plus lente par rapport à la croissance sur milieu YEM liquide, car dans le milieu gélosé l'aérobiose est réduite, par contre sur le milieu liquide, l'aérobiose est améliorée par l'agitation. Voir (fig 15 et Tableau 05).



**Fig 15 :** Aspect macroscopique des colonies de *Rhizobia* après sa culture sur milieu YEM à 28°C

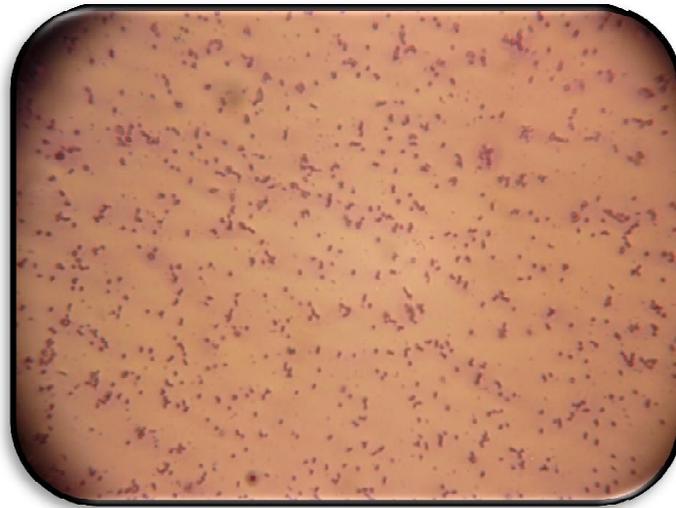
**Tableau 05:** Caractéristiques macroscopiques des cultures des souches autochtones isolées de *Médicago minima*.

<i>Caractères Souches</i>	<i>Aspect</i>	<i>Couleur</i>	<i>Forme</i>	<i>Contour</i>	<i>Diamètre (mm)</i>	<i>Croissance Surmilieu YEM gélosé</i>	<i>Croissance sur milieu YEM liquide</i>
<i>M01</i>	<i>Lisse</i>	<i>Blanchâtre à centre opaque</i>	<i>Circulaire</i>	<i>Régulier</i>	<i>1-3mm</i>	<i>72h</i>	<i>72h</i>
<i>M02</i>	<i>Lisse</i>	<i>Blanchâtre à centre opaque</i>	<i>Circulaire</i>	<i>Régulier</i>	<i>1-2mm</i>	<i>48h</i>	<i>48h</i>
<i>M03</i>	<i>Lisse</i>	<i>Blanchâtre à centre opaque</i>	<i>circulaire</i>	<i>Régulier</i>	<i>1-3mm</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
<i>M04</i>	<i>Lisse</i>	<i>Blanchâtre à centre opaque</i>	<i>Circulaire</i>	<i>Régulier</i>	<i>1-3mm</i>	<i>72h</i>	<i>72h</i>
<i>M05</i>	<i>Lisse</i>	<i>Blanchâtre à centre opaque</i>	<i>Circulaire</i>	<i>Régulier</i>	<i>1-2mm</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
<i>M06</i>	<i>Lisse</i>	<i>Blanchâtre à centre opaque</i>	<i>Circulaire</i>	<i>Régulier</i>	<i>1-2mm</i>	<i>72h</i>	<i>72h</i>

### III.2.1.1.2 Caractéristiques microscopiques :

L'aspect microscopique des isolats est visualisé après la coloration de Gram dont (voir fig 16) il montre que celle-ci présente des formes coccobacilles (bâtonnets courts).généralement isolés à Gram négatif ; l'observation de la culture à l'état frais montre leur mobilité. les caractères morphologiques observés correspondent à ceux décrits pour les *Rhizobiums* (Vincent, 1970 ; Dommergues et Mangenot ,1971 ; Jordan, 1984 ; de Lajudie et al. 1994 ; Rome et al

,1996). Néanmoins ces observations restent insuffisantes pour déterminer la position taxonomique exacte des isolats.



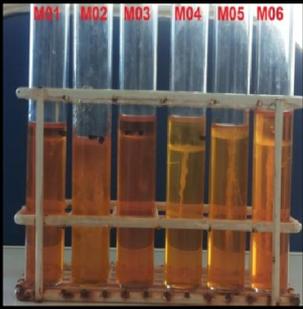
**Fig.16** :aspect microscopiques des isolats après coloration de gram (GX100)

### III.2.1.1.3 Test de mobilité des isolats :

Aussi bien que l'ensemencement des isolats sur le milieu Mannitol mobilité confirment que les souches isolées sont mobiles avec une acidification du milieu et production importante de gaz apparaît (Tableau 06) Ainsi que l'observation microscopique des isolats à l'état frais confirme leur mobilité.

Les caractères morphologiques observés correspondent à ceux décrits pour les *rhizobiums* (Vincent, 1970 ; Dommergues et Manganot, 1970 ; Jordan, 1984 ; De Lajudie, Willems *et al.*, 1994; Rome, Fernandez *et al.*, 1996). Néanmoins ces observations restent insuffisantes pour déterminer la position taxonomique exacte des isolats.

Tableau 06 : résultat issue après utilisation de milieu Mannitol de mobilité et après incubation à 28°C.

N° om de milieu	Compos ition de milieu	Aspect de milieu avant l'utilisation	Aspect de milieu après l'utilisation	Résultat
Milieu mannitol de mobilité	<p>- peptone de tryptique de viande</p> <p>- mannitol</p> <p>- KNO<sub>3</sub></p> <p>- Rouge de phénol</p> <p>Régénérer le milieu et refroidir</p>			<p>Caractère mannitol</p> <p>- milieu jaune : <b>Mannitol (+)</b></p> <p>- milieu rouge : <b>Mannitol (-)</b></p> <p><b>La mobilité :</b> Les bactéries très mobiles dans la gélose molle (étude de la mobilité).</p> <p>-On peut faire une recherche de nitrate réductase en ajoute : du réactif de graisse dans le tube après incubation. La lecture est alors identique à celle que l'on pouvoir faire avec un bouillon nitrate</p>

### III.2.1.2 Conservation des souches :

Après plusieurs repiquages toutes les souches pures et présentant les caractéristiques macroscopiques et microscopiques connues des *Rhizobiums*, sont conservées selon deux méthodes en double exemplaire sur milieu YEM solide incliné et dans du à glycérol 60 %. (Annexe1). (fig 17).



**Fig 17** : la conservation des souches dans milieu YEM solide.

### III.2.1.3 Croissance bactérienne :

Le suivi de la croissance des souches est une méthode utilisée afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle qui est en corrélation avec la production d'inoculum (Prin, Galiana et al., 1993).

#### • Aspect des cultures sur YEM liquide :

La croissance sur milieu YEM liquide est visible après 24h incubation pour tous les isolats étudiés. Le milieu devient trouble, visqueux et légèrement teinté en beige du à la production de mucus. Dans la littérature la turbidité est visible à différents temps en fonction de la vitesse de croissance des espèces de *Rhizobia*.

Chez les *Rhizobia* à croissance rapide tels que les *Sinorhizobium*, la turbidité est visible au bout de 2 à 3 d'incubation sous agitation (Vincent, 1970 ; Delajudie et al., 1998 et Young et al., 2001) contrairement aux souches de *Bradyrhizobium* dont la croissance est lente, la turbidité de ces cultures est visible au bout de 5 à 7 jours (Blondeau, 1980).

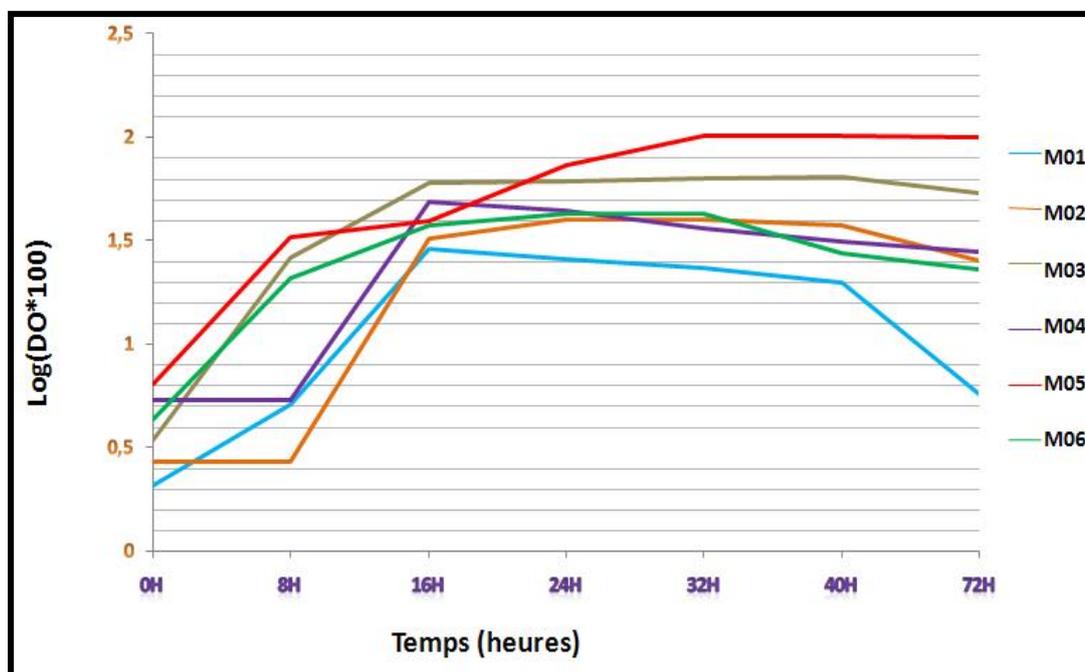
Ce qui laisse penser que nos isolats appartiennent aux *Rhizobia* à croissance rapide. Cette supposition sera confirmée par la cinétique de croissance.

#### • Cinétique de croissance :

Les travaux de Nour et al portant sur l'espèce *Mesorhizobium ciceri* ont montré que le *Rhizobium* à croissance rapide atteint sa croissance maximale après 36 à 72 heures en milieu liquide.

La densité optique mesurée est représentée dans la courbe (figure 18). A partir de ces résultats, les isolats peuvent être classés dans le genre *Rhizobium* à croissance rapide car la

moyenne du temps de génération est comprise entre 2 et 4 heures ce qui est une des caractéristiques des *Rhizobium* à croissance rapide (Jordan., 1982 ; Nour, Cleyet-Marelet al., 1994 ; Nour, Cleyet-Marel et al., 1995).



**Fig 18:** croissance bactérienne des isolats bactériens de *Medicago minima* (Maamora).

Pour les souches provenant de site de Maamora observée à partir des courbes en premier lieu nous remarquons que les souches ( M02 ,M04 ) présentent une phase de latence pendant les premières 8 heures ;cette phase d'adaptation est relativement courte car les composants de la pré-culture sont les même que ceux du milieu utilisé pour la croissance ,par contre les souches (M01,M03,M05,M06 )ont subit une augmentation continue pendant les 8 heures précédentes (phase exponentielle) c'est la phase ou les isolats se multiplient sans entrave, et ou la souche M05 Présente la meilleurs augmentation ,suive par la souche M03 selon certains auteurs le temps de génération des *Rhizobium* peut atteindre 4 à 5 heures selon les conditions de culture (Sauvage et al, 1983 ; Bernardt , Pocard et al,1986), au-delà de 16heures les souches se reposent ou bien leur nombre se stabilise (phase stationnaire),et après 24 heures d'incubation la phase de déclin apparait et ou le nombre de souches diminue considérablement(mortalité des souches) ce qui peut être du au manque de nutriments (milieu de culture non renouvelable).

### III.2.1.4 Effet de la température sur la croissance des isolats bactérien :

Les isolats ont été testés pour leur tolérance à différentes températures sur milieu YEM liquide et solide, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 07. La croissance est estimée par présence de trouble sur le milieu liquide.

**Tableau 07** : effet des diverses températures sur la croissance des isolats.

Souches							
Températures		M01	M02	M03	M04	M05	M06
4°C	Liquide	-	+	±	-	±	+
	Solide	±	+	+	±±	+	
28°C	liquide	++	++	+	++	+	++
	Solide	+++	+++	+++	+++	+++	++
37°C	liquide	++	++	++	+	+	++
	Solide	+++	+++	+++	+++	+++	++
45°C	Liquide	-	±±	-	-	±	
	Solide	-	-	±	-	-	+

+++ : Très bonne croissance (diamètre de colonie > 2mm)

++ : Bonne croissance (diamètre de colonie = 2mm)

+ : Croissance moyenne (diamètre de colonie < 2mm)

± : Faible croissance

- : Absence de croissance

## Chapitre III Résultats et Discussion

Nous remarquons que toutes les souches présentent une croissance plus ou moins importante avec une variabilité selon les différentes souches.

Les souches M01 et M04 ne présentent aucun développement à des températures 4°C sur le milieu YEM liquide par contre les souches M02 et M06 ont été les plus tolérantes à cette faible température. La plupart des souches ne peuvent pas tolérer des températures supérieures à 37°C sur le milieu YEM solide, c'est le cas de souches telles que M01, M04 et M05.

Les températures élevées peuvent mener à la réduction du nombre de cellules au dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation (Somasegaran, Reyes et al ,1984).

Toutes les souches présentent une bonne croissance à des températures situées entre 28°C et 37°C. Selon Graham (1992) certaines espèces de *Rhizobium* sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimal de croissance de la plupart des souches est 28°C. (fig 19).



Fig 19: Observation macroscopique des résultats de test de température de *Medicago minima*.

### III.3 Etude des inoculations des plantes *in-vitro* :

#### III.3.1 Test de nodulation :

L'infectivité des souches isolées a été testée sur leur même plante d'isolement (*Medicago minima*) l'essai a été réalisée *in-vitro* entube Gibson, 1980) contenant une solution nutritif pour les plantes (Rigaut et Puppo, 1975) en condition bactériologique, avec 5 répétition par souche et un témoin non inoculé.

Les nodosités obtenues sont de forme indéterminée indiquant la présence d'une zone mérisitimatique à croissance continue (Vasse et al, 1990). Cette forme est typique de la luzerne

(Duhoux et Nicole, 2004). Quelques nodules avaient une couleur rose qui indique leur richesse en leghémoglobine composé indispensable à la fixation d'azote (Blondeau, 1981).

A partir des résultats du test de nodulation, nous pouvons classer nos souches dans le groupe des *Rhizobiums* nodulants *Medicago minima* ; les *Rhizobiums* identifiés jusqu'à présent comme micro symbiotes des *Medicago* appartiennent au genre Ensifer (*Sinorhizobium*).

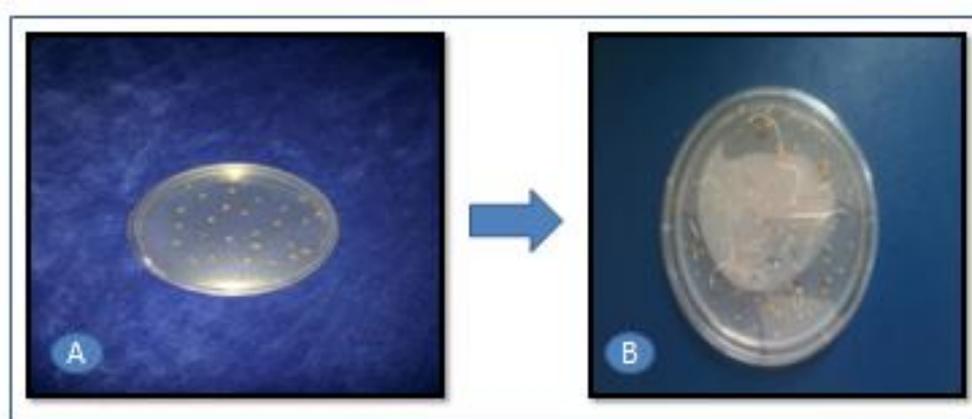
### III.3.2 Estimation du test de nodulation *in-vitro* :

#### III.3.2.1 Germination de graines :

Dans notre travail nous avons préféré la méthode de désinfection des graines à l'hypochlorite de sodium à 12° selon la méthode utilisée par (Tillard et Drevin , 1988), et la désinfection à l'acide sulfurique qui altère l'enveloppe de la graines et la fragilise, facilitant ainsi sa germination.

Plusieurs recherches (Koller et Negbi, 1955 ; Everitt, 1983 ; Flenneken et Fulbright, 1987) montrent que le traitement de la plupart des graines (*Cluteaistra Mille*, *Parkinsonia Aculeata* et *Accaciaschaffneri*, *Pspalumplacatum*) avec de l'acide sulfurique augmente le taux de germination.

Le taux de germination est de 36 % (Fig. 20). Malgré que la germination des graines de *Medicago* suit à la méthode de scarification mécanique (Dahmani, 1989 ; Bekki, 1997) est la plus utilisée. La méthode choisie reste pratique car la taille des graines de *Medicago minima* est très petite pour la scarification mécanique.



**Fig20** Germination des graines de *Medicago minima* sur eau gélosée.

((**A**) : les graines avant l'incubation, (**B**) : les graines après l'incubation

### III.3.2.2 Résultats du test de nodulation :

La capacité des souches à former des nodules avec la plante hôte (*Medicago minima*)

*In vitro* constitue le test de base pour confirmer la purification et l'appartenance de nos souches au genre *Rhizobium* (Burdon et al. 2000). La réussite de ce test nécessite le contrôle de plusieurs facteurs telle que : l'humidité, la lumière, et surtout l'élimination de tout type de contaminants au niveau des graines, la solution nutritive, et les milieux de cultures des souches. Il est important de tester la capacité des souches isolées à produire des nodules avec la plante d'origine à partir de laquelle ont été isolées (Beck, 1993).

La capacité des *Rhizobium* à produire une infection sur les racines des légumineuses et induire la formation des nodules est appelée l'efficacité. Le terme "efficacité" donne une indication de la capacité des plantes nodulées à fixer l'azote (Beck et coll., 1993). Cette propriété est limitée à un groupe spécifique de *Rhizobium* et l'hôte sur lequel l'infection est induite (Beck et al. 1993 ; ElHilali, 2006)

L'expérience a été réalisée *in-vitro* pour permettre le bon développement du système racinaire et pour évaluer la capacité de nos souches de former des nodules sur les racines des différents échantillons de *Medicago minima*. Mais nos souches ne forment pas les nodules, la question que nous nous posons pourquoi les nodules ne forment pas ?

probablement une cause de condition de laboratoire ou mauvaise qualité des produits ou la température de laboratoire plus élevée.

## Conclusion

L'introduction des inoculums dans le système sol/plante est utilisée pour augmenter le rendement des cultures. Les cultures de rhizobium sont préparées artificiellement et utilisées pour l'enrobage des semences avant le semis. Il est nécessaire de trouver, pour une légumineuse spécifique, une culture de rhizobium particulière disposant d'une capacité importante pour l'infection, la nodulation, la fixation de N<sub>2</sub>.

Les possibilités d'application des Biotechnologies (biofertilisants) pour le développement durable, l'utilisation des ressources renouvelables (azote atmosphérique) et l'économie de l'environnement. Basé sur l'exploitation raisonnables des interactions plante-microorganisme indigène et sa valorisation afin d'assurer un développement durable en respectant la sélection et le choix naturel.

Notre étude nous a permis de disposer une collection de six isolats issus des nodosités fraîches a été construite. Tous ces isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique. Tous les isolats sont des bactéries à Gram négatifs, en forme de bâtonnets, aérobies et à croissance rapide sur milieu YEM .

Les souches sont pures et des précautions strictes doivent être prises pour les conservées sur le milieu YEM solide incliné et dans du glycérol à 60%.

La détermination du temps de génération (entre 2 et 4heures) a permis de classer les isolats dans la catégorie des bactéries à croissance rapide, ceci nous a permis de déterminer la vitesse de croissance des souches ainsi que le temps nécessaire pour la production d'inoculum. .

Ainsi, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis de température extrêmes. C'est l'effet de la température qui a permis une distinction entre les différentes souches et leurs sites de collecte. En effet, la température optimale de croissance varie de 28°C à 37°C alors que la température maximale observée varie de 37°C à 45°C.

Ces isolats ont été authentifiés par inoculation des plantules de *Medicago minimacultivées in vitro*. Les résultats analysés après 21 jours d'inoculation ont montré que toutes les souches testées ont favorisé la nodulation par rapport au témoin non inoculé.

Les tests d'inoculation ont à nouveau confirmé la particularité de ces souches. En effet, elles ont la capacité après trois à quatre semaines d'inoculation ne forment pas les nodules.

L'étude dégage aussi des perspectives afin de vérifier la variabilité des Rhizobiums et d'appréhender l'efficacité (adaptabilité et compétitivité des souches) de la symbiose *Rhizobium/Medicago minima*. en milieu naturel :

- L'isolement, la caractérisation et la valorisation des souches bactériennes locales à haut pouvoir fixateur d'azote pour enrichir la collection de souches de rhizobia de Saida (Algérie).
- Sélection et préparation des inoculums (biofertilisant) Rhizobiens.
- Une étude plus approfondie sur les interactions entre les micro-organismes de la rhizosphère et en association avec les légumineuses.
- Le transfert des expérimentations aux champs en matière de production d'inoculum à base de souches performantes autochtones. (Test de leur efficacité à l'échelle pilote, en pépinière et dans des parcelles d'expérimentation)
- Renforcement du potentiel scientifique du laboratoire, acquisition de compétences et formation par la recherche.
- Promouvoir et création des pépinières de production d'inoculum biologique.
- Constitution d'une collection de souches provenant de divers légumineuses endémiques. etrépertories des souches dans une banque de donnée et référenciés dans une collection de l'université de saida.
- Mise au point des techniques de biologie moléculaire.
- Valorisation des ressources végétales naturelles en Algérie pour contribuer au développement, à l'amélioration de la sécurité alimentaire et de l'environnement par le biais de l'accroissement de la production végétale en respectant la stabilité environnementale pour le développement d'une agriculture biologique durable.

## **Annexe 1 : les produits utilisés**

- ✓ Milieu YEM (Yeast Extract Mannitol)

Les ingrédients :

Solution de Bergen Sen.	100ml
Extrait de levure	1g
Mannitol	10g
Eau distillée	900ml

- Solution Bergen Sen

Kcl	1g
FeCl <sub>3</sub>	0,02g
CaCl	0,53g
NaHPO <sub>4</sub>	4,5g
MgSO <sub>4</sub>	1g
Eau distillée	1000ml

### **La préparation :**

Peser les constituants précédemment écrits.

Agiter ces constituants jusqu'à l'obtention d'une solution homogénéisée (les mêmes étapes pour milieu YEM et solution Bergen Sen)

Ajuster le pH a : 6,8 à 7 par CaCO<sub>3</sub>.

NB : si en & besoin d'un YEM solide (gélose) ; on ajoute 20g d'Agar Agar avec augmentation de température.

- ✓ HgCl<sub>2</sub> (0,1%) :

### **Les ingrédients :**

HgCl <sub>2</sub>	1g
Eau distillée	100ml

### **La préparation :**

Agitation jusqu'à homogénéisation de produit.

✓ Glycérol (60%) :

Les ingrédients :

Glycérol 60ml

Eau distillée 40ml

La préparation :

Agitation jusqu'à l'homogénéisation de produit.

✓ Eau gélosé

Les ingrédients :

Agar Agar 1g

Eau distillée 100ml

La préparation :

Agitation jusqu'à l'homogénéisation de produit.

✓ Gélose nutritive :

Extrait de viande 1g

Extrait de levure 2g

Peptone 5g

NaCl 5g

Eau distillée 1000ml

Agar Agar 20g

✓ La solution nutritive (Rgand et puppa, 1975)

1) - solution A (macroéléments)

$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  0,2g

$\text{MgSO}_4$  0,2g

CaSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,2g
Kcl	0,2g
NaFe EDTEA	0,025g
NaMo <sub>4</sub>	0,004g
Eau distillée	qsp 1000ml

2)- solution B (microélément)

Kcl	750mg
NO <sub>3</sub> Na	600mg
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	250mg
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	125mg
FeCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1mg
MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,1mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1mg
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,03mg
H <sub>3</sub> BO	1mg
AlCl <sub>3</sub>	0,03mg
NiCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,03mg
IK	0,01mg
Eau distillée	qsp 1000ml

## Annexe 2 : les échelles

### 1. Standards de turbidité Mc Farland

Standards de turbidité numéro	Dihydrate de chlorure de Baryum (1,175%), en ml	Acide sulfurique (1%), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries/ml
1	0,1	9,9	$3 \cdot 10^8$
2	0,2	9,8	$6 \cdot 10^8$
3	0,3	9,7	$9 \cdot 10^8$
4	0,4	9,6	$12 \cdot 10^8$
5	0,5	9,5	$15 \cdot 10^8$
6	0,6	9,4	$18 \cdot 10^8$

### 2. le pH (Ollier et Foirée, 1983)

pH de sol	Désignation du sol	Spéculation
3,0-4,5	Extrêmement acide	Lands ou forts d'espaces acidophiles
4,5-5,0	Très fortement acide	Prairie
5,0-5,5	Très acide	Prairie espèces acidophile
5,5-6,0	acide	Prairie et cultures
6,0-6,75	Faiblement acide	Toutes cultures sauf espèces calcicoles
6,75-7,5	neutre	Toutes cultures
7,5-7,8	Faiblement alcalin	Toutes cultures sauf espèces calcifuges
7,8-8,5	Moyennement alcalin	
Plus de 8,5	Très alcalin	Croissance difficile

### 3. la conductivité électrique (ISS, [http://www.iges-stb.org/pdf/dico\\_donesol2.pdf](http://www.iges-stb.org/pdf/dico_donesol2.pdf))

Salinité (mS/cm)	Salinité du sol	Réponse des plantes
0à2	Non salé	Pas d'impact sur la croissance des plantes
2à4	Légèrement salé	La croissance des plantes sensibles peut être réduite
4à8	Moyennement salé	La croissance de plusieurs plantes est réduite
8à16	Salé	Bonnes croissance des plantes tolérantes au sel
>16	Très salé	Bonne croissance des plantes tolérantes au sel