

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة مولاي الطاهر، سعيدة
Université MOULAY Tahar, Saida



كلية العلوم
Faculté des Sciences
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master
En Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie et génomique végétale

Thème

Isolement, mise en évidence de *Rhizobium* associé au *Pisum Sativum* en vue de la production d'engrais biologique

Présenté par :

- M^{lle} : BAHRI AQILA
- Mr : BESSAFI Abdelkader

Soutenu le : 27/06/2022

Devant le jury composé de :

Président	M ^{me} . CHIKHI AMIRA	Pr Université UMTS MCB
Examineur	Mr. AMMAM Abdelkader	Université UMTS MCA
Rapporteur	M ^{me} . FARES SORIA	MCB Université UMTS

Année universitaire 2021/2022

REMERCIEMENT :

*Avant tous, nous remercions **ALLAH** le tout puissant d'avoir nous donner le courage, la volonté et la patience de mener à terme le présent travail, et mon grand salut sur notre prophète **Mohamed** que le salut soit sur lui.*

Nous tenons à remercier notre encadrante :

***Mme FARES SORIA** pour le sujet qui a été proposé et aussi pour leur soutien, leurs conseils judicieux et leur grande bien vaillance durant l'élaboration de ce travail.*

Nos remerciements également au :

- ***Président de jury : Mme CHIKHI AMIRA.***
- ***Examineur : Mr AMMAM ABDELKADER.***

D'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre travail.

En fin je remercie tous ceux qui ont participé de pré ou de loin a la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Grace à ALLAH le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, et ma donné la volonté de poursuivre le long chemin de mes études.

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

*À la lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie, mes parents : **AHMED** et **DJEMAA** qui m'ont soutenu durant toute ma vie. Que dieu me les gardes.*

*A mes très chers frères : **Mahmoud, Nour ddine, Abd El Wahhab.***

*Ames très chères sœurs: **Karima, Fouziya, Fatima Z, Fatima M, wahiba, Farida Chaimaa.***

*A les anges de ma famille: **Mohamed, Islam, Sohaib, Anes ,Ahmed Ayoub et Israa.***

*Ames grands parents : **Abd El Kader (paix à son âme) et Yakout***

*A toute ma famille paternelle **BAHRI** ainsi maternelle **BERRACHED.***

*A mes très chères sœurs de ma deuxième famille **Mamouni: Omi Rahmouna, Soumia, Khokha, Farida.***

*A mes chères amies :**Fatima ,Rajae ,Amina , Asma.***

*A mon binôme **Mr BESSAFI ABDELKADER** qui a eu la patience de me supporter Durant ce travail, et qui ma soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles.*

*A la promotion de **Biotechnologie Végétale** de l'année 2022 Tous ce que j'aime et qui je ne peux les citer, qu'ils me pardonnent.*

Tables des matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photographies	
Résumé	
Introduction	01

Chapitre I : Etude bibliographique.

I. La Symbiose Rhizobienne.....	03
I.1. Les partenaires de la symbiose rhizobienne.....	03
I.1.1. Partenaire bactérien.....	03
I.1.1.1. Généralités sur les rhizobia	04
I.1.1.2. Caractères morphologiques	04
La forme végétative.....	04
La forme bactéroïde.....	05
I.1.1.3. Caractères biochimiques.....	06
I.1.1.4. Caractères physiologiques.....	06
I.1.1.5. Caractères culturaux.....	06
I.1.1.6. Classification actuelle des <i>rhizobia</i>	06
I.1.2. Partenaire végétal.....	11
• <i>Pisum sativum</i>	
I.1.2.1. Taxonomie.....	12
I.1.2.2. Origine et répartition géographique.....	13
I.1.2.3. Description de la plante.....	13
I.1.2.4. Ecologie et croissance.....	13
I.1.2.5. Utilisations.....	14
I.1.2.6. Importance de la culture de pois et situation actuelle	14
I.2. Établissement de la symbiose.....	14

I.2.1. Développement des nodules.....	16
I.2.2. La structure du nodule.....	18
I.2.3. Génétique de la Fixation.....	19
I.3. Spécifié d'hôte.....	19
I.4. Intérêt de la symbiose Rhizobienne.....	19
I.5. Technologie de l'inoculation rhizobienne.....	20
I.5.1. Généralités sur les inoculums.....	21
I.5.2. Définition d'un inoculum.....	21
I.5.3. Critères de sélection d'un inoculum.....	21
I.5.4. Caractéristique d'un bon inoculum	22
I.5.5. Conservation et emploi de l'inoculum.....	22
I.5.6. Les contrôle de qualité d'un inoculum	22
I.5.7. Mode d'action d'un inoculum.....	23
I.5.8. Les buts de l'inoculum.....	23
I.5.9. Nécessité d'une inoculation.....	24
I.5.10. Cas de déficience en rhizobia.....	24

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Etat de lieu, prospections et choix de l'agroécosystème.....	25
II.2. Méthodologie suivi pour l'étude des <i>Rhizobium</i>	25
II.2.1. Isolement des rhizobia à partir des nodosités récoltées <i>in-natura</i>	25
II.2.1.1. Collecte des nodules.....	25
II.2.1.2. Conservation des nodules.....	27
II.2.1.3. Isolement et purification des isolats bactériens.....	28
II.3. Conservation des souches.....	30
III. Caractéristiques morphologiques, culturaux et physiologiques des isolats..	31
III.1. Caractères morphologiques.....	31
III.1.1. Observation macroscopique.....	31
III.1.2. Observation microscopique	32
III.2. Test physiologique.....	32
III .2.1. Effet de température.....	32

IV. Etude des paramètres symbiotiques.....	32
IV.1. Test d'infectivité des souches.....	32
IV.2. Désinfection et germination des graines.....	32
IV.3. Mise en place des plantules et inoculation.....	33
IV.4. Inoculation des plantules <i>in Vitro</i>	33
IV.5. Estimation de la croissance des plantes in-vitro et observation du phénotype des plantes inoculées.....	34

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Constitution d'une collection des Rhizobia.....	35
III.1.1. Caractéristiques morphologiques, et physiologiques des isolats	35
III.1.1.1. Etude macroscopique	35
III.1.1.2. Etude microscopique.....	38
III.1.1.3. Etude physiologique.....	39
III.1.1. 3.1. Effet de la température.....	39
III.1.2. Etude symbiotique.....	41
III.1.2.1. Analyse phénotypique des nodules.....	42
III.1.2.2. Evaluation des parties aériennes et racinaires.....	43
a) Poids frais de la partie racinaire.....	44
b) Poids frais de la partie aérienne.....	45
Conclusion.....	46
Référence bibliographique.....	47
Annexe.	

Liste des figures

Figure 1	Nodules racinaires (a) et tige portant des nodules aériens matures (b) (DUHOUX et NICOLE, 2004)
Figure 2	Morphologie de rhizobium (site web 4)
Figure 3	Bactéries du genre <i>Rhizobium</i> vues au microscope (x 1 000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.
Figure 4	La plante du petit pois
Figure 5	<i>Pisum sativum</i>
Figure 6	Schéma d'une fleur, étamines et gousse de pois
Figure 7	Dialogue moléculaire de la symbiose légumineuse-rhizobium (Rasebery ; 1997) .
Figure 8	Les principales étapes de la formation des nodosités. (Long et Staskawicz,1993).
Figure 9	Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>rhizobium</i> et une plante (Perry <i>et al.</i> 2004)
Figure 10	La structure du nodule (site web 6)
Figure 11	Conservation des nodules sous CaCl ₂ (Vincent, 1970).
Figure 12	Méthode de stérilisation et l'isolement selon la méthode des nodules écrasés.
Figure 13	Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).
Figure 14	Repiquage sur tube gélose incliné d'après Vincent (1970).
Figure 15	Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisés <i>in-vitro</i>
Figure 16	L'effet des souches bactériennes sur le nombre des nodules.
Figure 17	La longueur des parties aériennes de <i>Pisum sativum</i>
Figure 18	Poids frais de la partie racinaire de <i>Pisum sativum</i>
Figure 19	Poids frais de la partie aérienne de <i>Pisum sativum</i>

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 01	champ de pois cultivé à la ferme de GUERROUDJ en 2022 (<i>Pisum sativum</i>)
Photographie 02	Zone de prélèvement de <i>Pisum sativum</i> (la ferme agricole GUERROUDJ Elhadj Saida).
Photographie 03	la collecte des nodules
Photographie 04	Le rinçage des racines.
Photographie 05	Désinfection la germination des graines
Photographie 06	Aspect morphologique des isolats après 72 h d'incubation à 28 °C
Photographie 07	Observation microscopique des bactéries x 100
Photographie 08	Croissance des souches sur milieu YEM solide dans des différentes températures pendant 48 h
Photographie 09	Croissance <i>in vitro</i> des plantes de <i>Pisum sativum</i> inoculées avec les isolats bactériens.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01	Classification actuelle des <i>Rhizobium</i> (Weir, 2016).
Tableau 02	isolats bactériens obtenus à partir de nodules dans la zone semi-aride (domaine BOUHRIT Hasasna Saida).
Tableau 03	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats
Tableau 04	Croissance des souches sur milieu YEM solide et liquide dans des différentes température pendant 48 à 72 h

Liste d'abréviation

(YEM): Yeast Extract Mannitol

(Atm) : Atmosphère

mm : millimètre

µm : micromètre

Cm : centimètre

° **C** : degré Celsius

v/v : Volume pour volume

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

HgCl₂ : Chlorure mercurique

(LCO) : lipo-chitooligosaccharides

Résumé

Les engrais biologiques jouent un rôle très important dans les travaux du sol et de végétation pour améliorer la rentabilité des terres et d'assurer la sécurité alimentaire.

Cette étude rentre dans le cadre des activités de recherches interdisciplinaire et participative de l'intégration des microorganismes dans le système de l'agriculture. Et Dans le but de contribuer à la recherche scientifique qui préconise des stratégies basées sur l'utilisation des engrais biologiques ou biofertilisants à base de *Rhizobium*.

De ce fait notre étude ont été menée pour récapitulé les connaissances acquises de technologie d'étude de statut rhizobien ; C'est la raison pour laquelle nous a permis de constituer un soucier des rhizobia performants, un isolement des rhizobia de *Pisum sativum*. Cette étude nous a permis de s'isoler 10 souches de *Rhizobium* provenant de la région semi-aride de Hassasna Saida (**AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4**). L'étude symbiotique de ces souches a montré qu'à l'exception de la souche AQ2, toute les souches testées était infectives et efficaces vis-à-vis de *Pisum sativum*. Quant à l'étude physiologique, une tolérance à la température à été notée pour l'ensemble des souches. La meilleure tolérance est observée chez les souches **BAA1, AQ2 et AQ5**.

Mots clés : engrais biologiques, sécurité alimentaire, microorganismes, *Rhizobium*, soucier, *Pisum sativum*.

Abstract

Organic fertilizers play a very important role in soil and vegetation work to improve land profitability and ensure food security.

This study is part of the interdisciplinary and participatory research activities of the integration of microorganisms in the agricultural system. And In order to contribute to the scientific research that advocates strategies based on the use of organic or biofertilizers based on Rhizobium.

As a result our study was conducted to recapitulate the acquired knowledge of rhizobian status study technology; This is the reason why we were able to constitute a powerful rhizobia strain, an isolation of the rhizobia of *Pisum sativum*. This study allowed us to isolate 10 strains of Rhizobium from the semi-arid region of Hassasna Saida (AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4). The symbiotic study of these strains showed that, with the exception of the AQ2 strain, all the strains tested were infectious and efficient vis-à-vis *Pisum sativum*. For the physiological study, a temperature tolerance was noted for all strains. The best tolerance is observed in BAA1, AQ2 and AQ5 strains.

Keywords: organic fertilizers, food safety, microorganisms, Rhizobium, souchier, *Pisum sativum*.

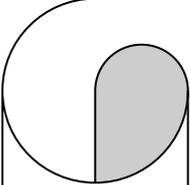
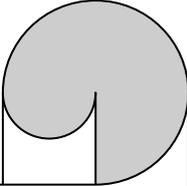
ملخص

تلعب الأسمدة العضوية دورًا مهمًا للغاية في أعمال التربة والغطاء النباتي لتحسين ربحية الأراضي وضمان الأمن الغذائي.

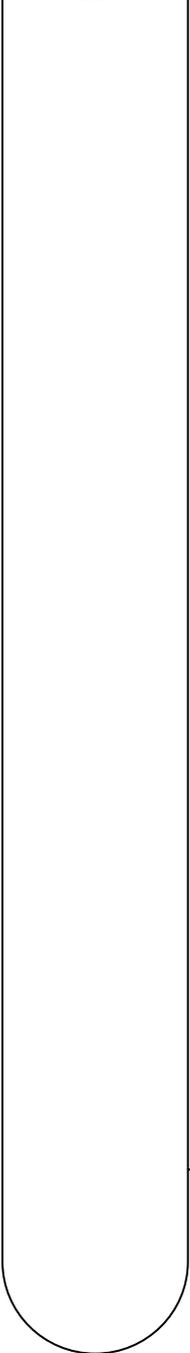
هذه الدراسة هي جزء من أنشطة البحث متعددة التخصصات والتشاركية لدمج الكائنات الحية الدقيقة في النظام الزراعي. ومن أجل المساهمة في البحث العلمي الذي يدعو إلى استراتيجيات قائمة على استخدام الأدوية العضوية أو الأحيائية القائمة على الريزوبيوم.

ونتيجة لذلك، أجريت دراستنا لتلخيص المعرفة المكتسبة بتكنولوجيا دراسة الحالة الجذبية ؛ هذا هو السبب في أننا تمكنا من تشكيل سلالة ريزوبيا قوية، عزلة لجذبية بيسوم ساتيفوم. سمحت لنا هذه الدراسة بعزل 10 سلالات من الريزوبيوم من منطقة حساسنا صيدا شبه القاحلة، (AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4) أظهرت الدراسة التكافلية لهذه السلالات، باستثناء سلالة AQ2 ، أن جميع السلالات التي تم اختبارها كانت معدية وفعالة مقابل *Pisum sativum*. بالنسبة للدراسة الفسيولوجية، لوحظ تحمل درجة الحرارة لجميع السلالات. يُلاحظ أفضل تحمل في سلالات BAA1 AQ2 AQ5.

الكلمات المفتاحية: الأسمدة العضوية، سلامة الأغذية، الكائنات الحية الدقيقة، ريزوبيا، سوشيبه، بيسوم ساتيفوم



Introduction



Introduction :

Globalement, la moitié de la fixation biologique d'azote est réalisée par la symbiose rhizobienne, soit 200 millions de tonnes d'azote sont fixés par an (Ferguson *et al.*, 2010). Elle permet de enrichir les sols en azote, de remplacer l'apport des engrais azotés et de satisfaire 90% de la nutrition des légumineuses (Berrada et Benbrahim, 2014).

La symbiose rhizobienne est aussi impliquée dans la protection des légumineuses contre les stress abiotique et biotique par une compétition nutritive entre les rhizobia et l'agent pathogène envers la source de carbone (Bordeleau, 1989 ; Ehteshamul-haque *et al.*, 1992).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine ou parfois sur la tige de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées nommées nodules (Dénarié *et al.*, 1996). Au sein des nodules, la bactérie différenciée en bactéroïdes transforme l'azote de l'air en une forme directement assimilable par la plante. En échange la plante fournit à la bactérie les substrats carbonés issus de la photosynthèse.

La capacité de 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).

De nombreux chercheurs portent un intérêt croissant à l'utilisation des rhizobia dans la bio fertilisation et la lutte biologique contre les phytopathogènes du sol.

L'importance alimentaire des fabacées Sur le plan nutritionnel, les fabacées présentent une source de protéines végétales importante (20 à 30%) pour l'alimentation animale (soja, luzerne,...) et humaine (haricot, pois, fève,...). Elles sont riches en éléments minéraux et en vitamines de type B. Elles sont parmi les produits caloriques car elles contiennent 340 calories pour 100 gramme et sont riches en glucides (55% en moyenne) (Khaldi et Zekri, 2002).

En Algérie, la culture des légumineuses à grains constitue avec les céréales une composante de base dans les cultures traditionnelles importantes, qui sont le pois chiche, la lentille, la fève, la féverole, et le pois, ces légumineuses sont intégrées à la nutrition animale et humaine.

A travers cette étude, nous chercherons d'abord à apporter une petite contribution à des recherches consacrées à ce mouvement scientifique, nous voulons étudiée la symbiose rhizobienne.

Da ce fait ; l'objectif du présent travail est d'enrichir la collection de souches de rhizobia d'Algérie et constitution d'un soucier de bactéries provenant de pois (*Pisum sativum*) d'une région zone semi-aride à Saida.

Dans ce cadre d'étude, l'objectif de notre recherche consiste à :

- Isoler, purifier et conserver des souches de rhizobia à partir des nodosités prélevées sur des plants de *Pisum Sativum*.
- Etudier l'infectivité des isolats de *Pisum Sativum*.
- Caractériser les isolats d'un point de vue cultural, morphologique et physiologique.

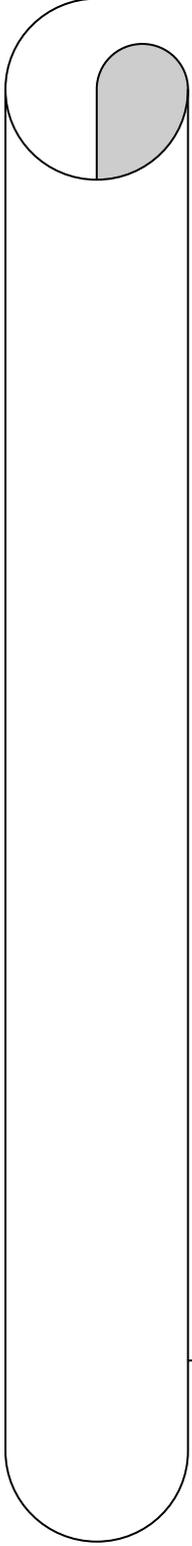
Notre travail est organisé en trois chapitres.

Le premier chapitre s'articule en trois volets. En premier lieu, un état des connaissances générales sur la symbiose rhizobienne associatives avec la plante *Pisum sativum*, Un deuxième volet a été consacré au Caractéristiques des rhizobia. Et Un accent particulier est ensuite porté sur mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique. Ce chapitre inclut aussi l'intérêt de la symbiose rhizobienne

Le deuxième chapitre est consacré au protocole expérimental, la présentation du matériel biologique ainsi que les différentes techniques d'analyses utilisées au cours de cette étude.

Dans une troisième partie à l'analyse des données et l'interprétation des résultats. Cette partie est constituée de deux sous parties. Nous étudierons dans la première, l'aspect macroscopique, microscopique, croissance des isolats sur milieu YEM solide et liquide (effet de température), et l'évaluation de de la performance symbiotique des isolats dans les conditions bactériologiques contrôlés.

En fin, le travail sera achevé par une conclusion générale qui englobe des suggestions et des perspectives.



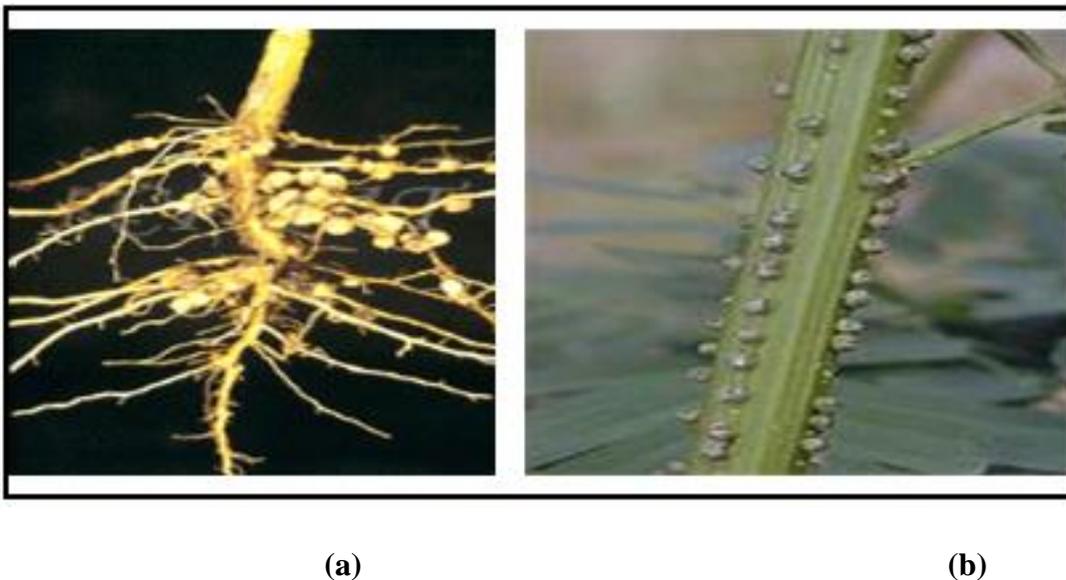
CHAPITRE 01 :

Etude bibliographique

I. La Symbiose Rhizobienne

La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines (**Figure 1a**) ou plus rarement sur les tiges à partir de primordia racinaires dormants et disposés en rang le long de la tige (**Figure 1b**). C'est au sein de cet organe protecteur que l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries.

Du grec rhiza (qui signifie racine) et bio (vie), rhizobium signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Ce sont des bactéries procaryotes, aérobies et chimiotrophes du sol (Somasegaran et Hoben, 1994).



**Figure 01 : Nodules racinaires (a) et tige portant des nodules aériens matures (b)
(DUHOUX et NICOLE, 2004)**

I.1. Les partenaires de la symbiose rhizobienne :

I.1.1. Partenaire bactérien

Les bactéries *Rhizobium* sont des organismes libres vivant dans la rhizosphère et se nourrissant des restes d'organismes morts (**Site web 2**). Puisqu'ils contiennent un plasmide dont la fonction est de coder des informations essentielles à l'infection de la plante hôte.

Évidemment, ces types de bactéries ont leurs propres caractéristiques, que nous verrons ci-dessous (**site web 3**) :

- Gram négatif
- Double couche de paroi cellulaire : alors que la première est constituée de protéines et de glucides, la seconde est constituée de glucides et de lipides.
- Procaryotes
- Bacilles mobiles : lorsque le test de motilité est effectué, la couleur qu'ils acquièrent est le jaune, et non leur couleur d'origine, qui serait le violet.
- Aérobies : L'oxygène est essentiel à leur croissance.
- Bêta : digestion de l'hémoglobine.
- Développement optimal à 25 ° C, mais peut pousser à presque toutes les températures.
- Dimensions : 0.5-0.9 x 1.2-3.0 micromètres.
- A des flagelles.

I.1.1.1. Généralités sur les rhizobia

La biodiversité microbienne constitue une ressource naturelle énorme pour l'humanité (Longfei Zhao et al, 2010), les *rhizobia* sont des bactéries capables de former des nodules et établir une symbiose avec les racines ou les tiges des plantes légumineuses. Pendant le processus symbiotique, les *rhizobia* sont capables de réduire l'azote atmosphérique à une forme assimilable (ammonium) directement par les plantes (Barrada et Fikri - Benbrahim, 2014).

I.1.1.2. Caractères morphologiques

Les *rhizobia* sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobie non sporulantes, et généralement mobile grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles (Jordan, 1984 et Werner, 1992) ces bactéries peuvent exister sous deux formes :

La forme végétative que l'on trouve dans le sol et la forme bactériode que l'on rencontre à l'intérieur des cellules de cortex racinaire (Werner, 1992).

➤ La forme végétative :

Les *rhizobia* sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux 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 *rhizobia* à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les *rhizobia* à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

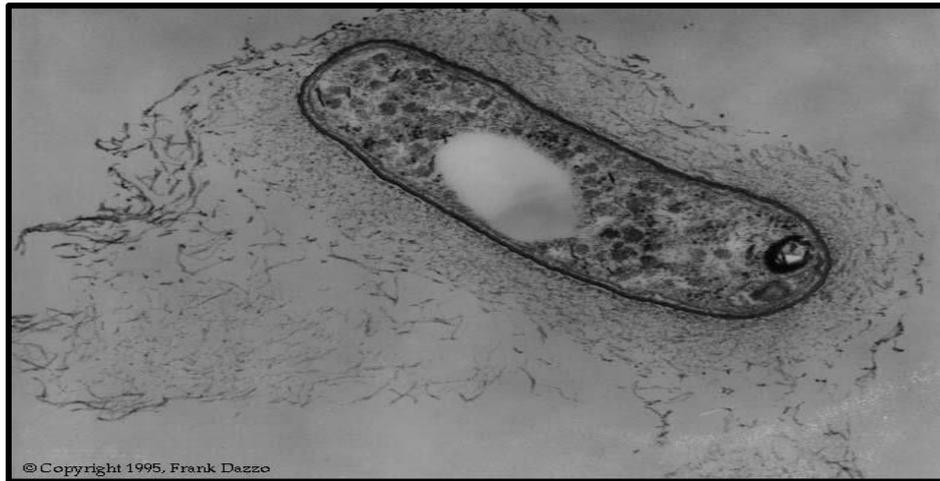


Figure 02 : Morphologie de rhizobium (site web 4)

➤ **La forme bactéroïde :**

À l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les *rhizobia* se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. 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) (Duhoux et Nicole, 2004).

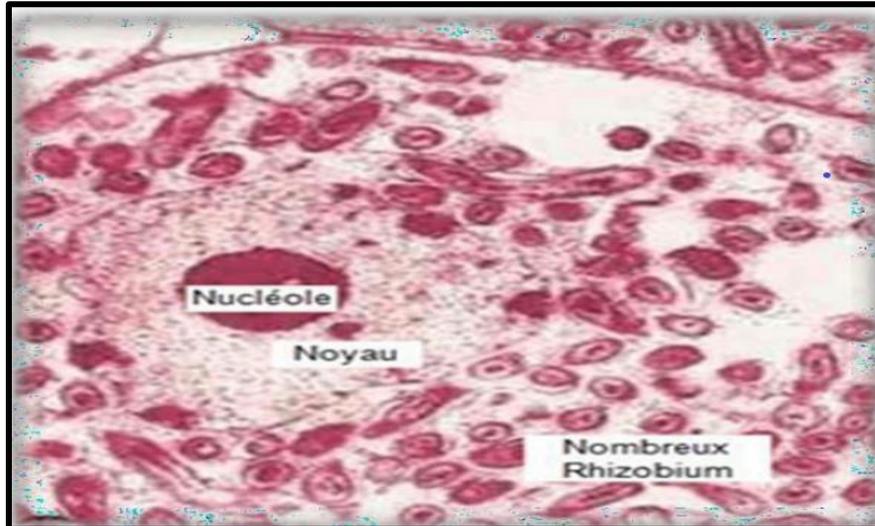


Figure 03 : Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope (x 1 000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.

(bacteroids.jpg (136×179) (biologia.edu.ar))

I.1.1.3. Caractères biochimiques

Les *rhizobia* sont des bactéries hétérotrophes, 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).

I.1.1.4. Caractères physiologiques

Rhizobium est un microorganisme 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 al, 1994).

I.1.1.5. Caractères cultureux

Les *rhizobia* à croissance rapide, produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours. Les *bradyrhizobiums* à croissance lente, produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours. Les *rhizobia* cultivés nécessitent un milieu de culture, qui contient une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux (Somasegaran et Hoben, 1994). Le yeast mannitol agar (Y) est un milieu solide favorable pour la culture de *rhizobia*, sur lequel, la colonie apparaît ronde, blanche, opaque ou blanche laiteuse, humide, translucide, et elle peut être lisse et brillante ou rugueuse. Les colonies jaunes sont pâles, en particulier dans les cultures plus anciennes (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

I.1.1.6. Classification actuelle des *rhizobia*

Les *rhizobia* ou bactéries nodulant les légumineuses sont classées au début sur la base des spécificités de l'hôte.

Tableau 01 : Classification actuelle des *Rhizobium* (Weir, 2016).

Chapitre I : Etude bibliographique

Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>		
Ordre: <i>Rhizobiales</i>		
Famille: <i>Rhizobiaceae</i>		
Genres	Espèces	Source d'isolement
<i>Rhizobium</i>	<i>R.</i> <i>leguminosarum</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>trifolii</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>trifolii</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>trifolii</i> <i>R. galegae</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>officinale</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>orientale</i> <i>R. tropici</i> <i>R. leucaenae</i> <i>R. tropici</i> <i>R. endophyticum</i> <i>R. phaseoli</i> <i>R. fabae</i> <i>R. etli</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>mimosae</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>phaseoli</i> <i>R. undicola</i> <i>R. gallicum</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>phaseoli</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>gallicum</i> <i>R. giardinii</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>phaseoli</i> <i>Symbiobacterium</i> <i>giardinii</i> <i>R. hainanensis</i> <i>R. huautlense</i> <i>R. mongolense</i> <i>R. yanglingense</i> <i>R. larrymoorei</i> <i>R. indigoferae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Galega, Leucaena</i> <i>Galegaorientalis</i> <i>Galegaofficinalis</i> <i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Vicia faba Phaseolus</i> <i>Mimosa affinis</i> <i>Phaseolus</i> <i>Neptunianatans</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> <i>Desmodiumsinuatum, Centrosema.</i> <i>Sesbania herbacea Medicago ruthenica,</i> <i>Phaseolus Amphicarpaea</i> <i>Ficus benjamina</i> <i>Indigoferaspp.</i>

	<p><i>R. sullae</i> <i>R. loessense</i> <i>R. cellulosityticum</i> <i>R. miluonense</i> <i>R. multihospitium</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. pisi</i> <i>R. mesosinicum</i> <i>R. alamii</i> <i>R. alkalisoli</i> <i>R. tibeticum</i> <i>R. tubonense</i> <i>R. halophytocola</i> <i>R. radiobacter</i> <i>R. rhizogenes</i> <i>R. rubi</i> <i>R. vitis</i> <i>R. nepotum</i></p>	<p><i>Hedysarum</i> <i>Astragalus, Lespedeza</i> <i>Populus alba</i> <i>Lespedeza</i> Plusieurs espèces de légumineuses <i>Oryzaalta</i> <i>Pisumsativum</i> <i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i> <i>Arabidopsisthaliana</i> <i>Caraganaintermedia</i> <i>Trigonella archiducis-nicolai</i> <i>Oxytropisglabra</i> usine de dunes côtières</p>
<i>Ensifer</i>	<p><i>E. meliloti</i> <i>E. fredii</i> <i>Symbiovarfredii</i> <i>Symbiovarsienensis</i> <i>E. sahelense</i> <i>E. terangae</i> <i>Symbiovaracaciae</i> <i>Symbiovar sesbania</i> <i>E. medicae</i> <i>E. arboris</i> <i>E. kostiense</i> <i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobiumxingianense</i>) <i>E. adhaerens</i> <i>E. kummerowiae</i> <i>E. americanum</i> <i>E. mexicanus</i> <i>E. numidicus</i></p>	<p><i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i> <i>Glycine, Vigna, Cajanus</i> <i>Glycine</i> <i>Acacia, Prosopis, Neptunia,</i> <i>Leucaena</i> les plantes hôtes différentes <i>Acacia</i> <i>Sesbania</i> <i>Medicago truncatula, Melilotus</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Glycine max</i> <i>Kummerowia stipulaceae</i> <i>Acacia</i> <i>Acacia angustissima</i> <i>Medicago sativa</i></p>
<i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i>		
<i>Mesorhizobium</i>	<p><i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i> <i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. amorphae</i> <i>M. chacoense</i></p>	<p><i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus.</i> <i>Astragalus sinicus</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis.</i> <i>Amorpha fruticosa</i> <i>Prosopis alba</i></p>

Chapitre I : Etude bibliographique

	<i>M. septentrionale</i> <i>M. temperatum</i> <i>M. thioanganeticum</i> <i>M. albiziae</i> <i>M. caraganae</i> <i>M. gobiense</i> <i>M. tarimense</i> <i>M. australicum</i> <i>M. opportunistum</i> <i>M. metallidurans</i> <i>M. alhagi</i> <i>M. camelthorni</i> . <i>M. abyssinicae</i> <i>M. muleiense</i> <i>M. hawassense</i> <i>M. qingshengii</i> <i>M. robiniae</i> <i>M. shonense</i> <i>M. shangrilense</i> <i>M. silamurunense</i> <i>M. tamadayense</i>	<i>Astragalus adsurgens</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Albzia kalkora</i> <i>Caraganas pp.Wild</i> <i>legumes Wild</i> <i>legumes Biserrula pelecinus</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Alhagi Alhagi sparsifolia</i> Différents arbres agroforestiers delégumineuses <i>Cicer arietinum</i> Différents arbres agroforestiers delégumineuses <i>Astragalus sinicus</i> <i>Robinia pseudoacacia</i> Différents arbres agroforestiers delégumineuses <i>Caragana espèce</i> <i>Astragalus espèce</i> <i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>
<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Family: <i>Methylobacteriaceae</i>		
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>
<i>Microvirga</i>	<i>M. lupini</i> <i>M. lotononidis</i> <i>M. zambiensis</i>	<i>Lupinus sp</i> hôte légumineuse Different.hôte légumineuse Different
Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>		
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i> <i>A. dobereinerae</i> <i>A. oxalatiphilum</i>	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgate</i>

Chapitre I : Etude bibliographique

<i>Devosia</i>	<i>Devosianeptuniaie</i>	<i>Neptunianatans</i>
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i>		
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> <i>B. iriomotense</i> <i>B. jicamae</i> <i>B. lablabi</i> <i>B. huanghuaihaiense</i> <i>B. cytisi</i> <i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Lespedeza</i> <i>Betaevulgaris</i> <i>Genistea et</i> <i>Loteae</i> <i>Entada</i> <i>koshunensis</i> <i>Pachyrhizus</i> <i>erosus</i> <i>Lablab</i> <i>purpureus</i> <i>Glycine max</i> <i>Cytisus villosus</i> <i>Glycine max</i>
	<i>B. denitrificans</i> <i>B. oligotrophicum</i> <i>B. pachyrhizi</i>	<i>Aeschynomene</i> <i>Pachyrhizus erosus</i>
Classe: <i>Beta Proeobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i>		
<i>Burkholderia</i>	<i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. nodosa</i> <i>B. sabiae</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. rhizoxinica</i> <i>B. diazotrophica</i> <i>B. endofunorum microsporus</i> <i>B. heleia</i> <i>B. symbiotica</i>	<i>Vertisol</i> <i>microaggregates</i> <i>Alysicarpus</i> <i>glumaceus</i> <i>Aspalatus</i> <i>carnosa</i> <i>Machaerium</i> <i>lunatum</i> <i>Mimosa bimucronata,</i> <i>Mimosascabrella</i> <i>Mimosa</i> <i>caesalpiniifolia</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus</i> <i>microsporus</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus</i> <i>Eleocharis</i> <i>dulcis</i> <i>Mimosa</i> <i>spp.</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Aspalatus carnosa , Mimosa sp.</i>

I.1.2. Le partenaire végétal

- *Pisum sativum*

Sur le plan nutritionnel, les fabacées présentent une source de protéines végétales importante (20 à 30%) pour l'alimentation animale (soja, luzerne,) et humaine (haricot, pois, fève,). Elles sont riches en éléments minéraux et en vitamines de type B. Elles sont parmi les produits caloriques car elles contiennent 340 calories pour 100 gramme et sont riches en glucides (55% en moyenne) (Khaldi et Zekri, 2002).



Photographie 01 : champ de pois cultivé à la ferme de GUERROUDJ en 2022 (***Pisum sativum***).

Le genre *Pisum*, est classé dans la tribu des Fabeae (ou Viciae), sa classification récente ne regroupe plus que trois espèces (Smykal et al. 2011).

***P. sativum*L.**

- Subsp. *Sativum* (comprend var. *sativum* et var. *arvense*).
- Subsp. *elatius*

P. fulvum

P. abyssinicum



Figure 04 : La plante du petit pois (site web 7)

I.1.2.1. Taxonomie (site web 8)

Règne : Plantae

Sous règne : Viridiplantae

Infra règne : Magnoliopsida

Super division : Embryophyta

Division : Tracheophyta

Sous division : Spermatophytina

Classe : Magnoliopsida

Super ordre : Rosanae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Pisum* L.

Espèce : *Pisum sativum* L.



Figure 05 : *Pisum sativum*

I.1.2.2. Origine et répartition géographique

L’Ethiopie et l’Asie occidentale ont été désignées par la FAO comme centres de diversité de *Pisum sativum*, avec des centres secondaires dans le sud de l’Asie et la région méditerranéenne. Le pois était bien connu dans les régions montagneuses d’Afrique centrale et orientale avant l’arrivée des Européens. Actuellement, *Pisum sativum* se trouve dans tous les pays tempérés et dans la plupart des hautes terres tropicales et orientales (Messiaen et al., 2006).

I.1.2.3. Description de la plante

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une plante herbacée grimpante annuelle, son système racinaire est pivotant. La racine principale vigoureuse peut descendre en profondeur et porter de nombreuses nodules fixatrices d’azote lorsque les conditions pédoclimatiques sont favorables. Les feuilles, à l’exception des 2 premières réduites à des écailles, sont composées pennées. Le rachis porte de sa base à son extrémité plusieurs paires de folioles opposées dont le nombre varie selon la variété, une ou plusieurs paires de vrilles opposées, occupant la position de folioles, et en fin une vrille en position terminale. Les fleurs du petit pois sont blanches ou pourpres, elles sont zygomorphes, pentamères et hermaphrodites (Srarfi et Kharrat, 2010). Le fruit est une gousse, ou cosse, bivalve, de 4 à 11 cm de longueur contenant 5 à 10 graines rondes lisses ou ridées (Srarfi et al., 2008).

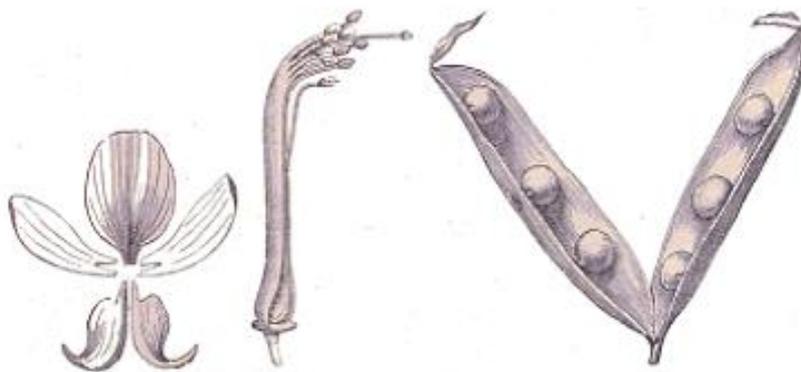


Figure 06 : Schéma d’une fleur, étamines et gousse de pois

I.1.2.4. Ecologie et croissance

Le pois cultivé est une plante de climat tempéré frais et relativement humide, pour des rendements optimaux, la température doit être comprise entre 13 et 21°C. La pluviométrie idéale se situe entre 800 et 1000 millimètres par an. Il est peu sensible à la photopériode. Le pois

s'accommode sur des sols de toutes natures, bien drainés et à pH entre 5,5 et 7,0 (Messiaen et al. 2006).

I.12.5. Utilisations

Le pois est une principale source de plusieurs types d'aliments pour l'homme comme pour les animaux. Il existe trois principaux types de cultivars de pois : le pois sec, cultivé pour ses graines sèches ; le petit pois, cultivé pour ses graines vertes immatures ; et le pois mangetout, cultivé pour ses gousses immatures. Dans les pays occidentaux, les graines mûres de pois sont très utilisées pour l'alimentation animale. Les pailles sont utilisées comme fourrage, foin, ensilage ou engrais vert (Messiaen et al. 2006).

I.1.2.6. Importance de la culture de pois et situation actuelle

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une légumineuse ayant des intérêts alimentaires agronomiques, économiques et écologiques importants, du fait qu'il enrichit le sol en azote (30 à 50 Unités/ha), suite à la symbiose avec son *Rhizobium* spécifiques, fixateur de l'azote de l'air. Sa valeur alimentaire est liée surtout à la teneur élevée en matières azotées totales de ses graines qui varie de 23 à 33% selon les variétés (Srarfi et Kharrat, 2010). Il est riche en calories, sucres, vitamine A, C et des éléments minéraux tels que P, K, Ca, Mg et Fe. Le pois présente une haute palatabilité et un faible contenu en facteurs antinutritionnels, en plus de sa richesse en protéines (18 à 30%) et en lysine. Cette espèce est caractérisée par un faible taux de matière grasse (1,15%) hautement insaturée (49% d'acide linoléique), une fraction d'hydrocarbure qui représente 70% du poids total incluant un haut contenu en amidon et des proportions significatives de sucres solubles (6%) et d'oligosaccharides (Ali et al., 2008). Le petit pois est surtout cultivé à Biskra (irrigué), Tipaza, Boumerdes, Mostaganem et Tlemcen (en sec). C'est une culture conduite manuellement. La variété Merveille de Calvedon est très répandue en Algérie.

I.2. Établissement de la symbiose

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'infecter les plantes de la famille des légumineuses, par leur aptitude à induire la formation de nodules sur la partie racinaire de la plante hôte comme c'est le cas chez les deux Légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, au formation de nodules au niveau des tiges comme dans le cas de l'interaction *Sesbania rostrata* - *Azorhizobium caulinodans*, et à réduire l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante. Dans cette section, les données relatives à l'infection des légumineuses et au développement des nodules racinaires ou caulinaires sont brièvement présentées (Selami, 2017).

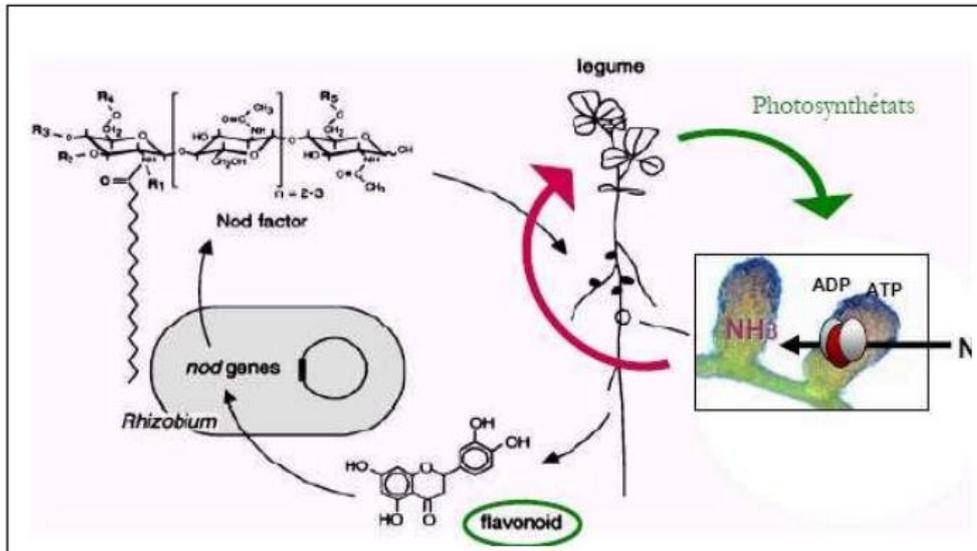


Figure 07 : Dialogue moléculaire de la symbiose légumineuse-rhizobium (Rasebery ; 1997) .

La formation d'une nodosité se déroule ont une séquence d'événements dans les étapes suivantes :

➤ **Pré infection**

L'interaction commence avec la colonisation des jeunes *Rhizobium* au niveau des poils absorbant, où ils catabolisent des substances racinaires excrétées. Après une phase de multiplication active dans la rhizosphère, les bactéries se trouvant en contact avec la plante hôte, s'adsorbent aux poils absorbants. Des glycoprotéines végétales appelées lectines, permettant leur adhésion au poile absorbant de la racine (Selami, 2017).

A cette étape ; débute un échange des signaux moléculaires entre les deux partenaires, principalement des flavonoïdes (Long, 1996), Ces molécules sont sécrétées par la plante hôte, qui sont capables d'activer la transcription des gènes Nod chez les *rhizobia*. Les facteurs NOD sont des lipo-chitooligosaccharides (LCO) émis par la bactérie, à l'origine de la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques (Miklashevichs et al ; 2001).

➤ L'infection

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée.

La croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité. (**Figure 8**)

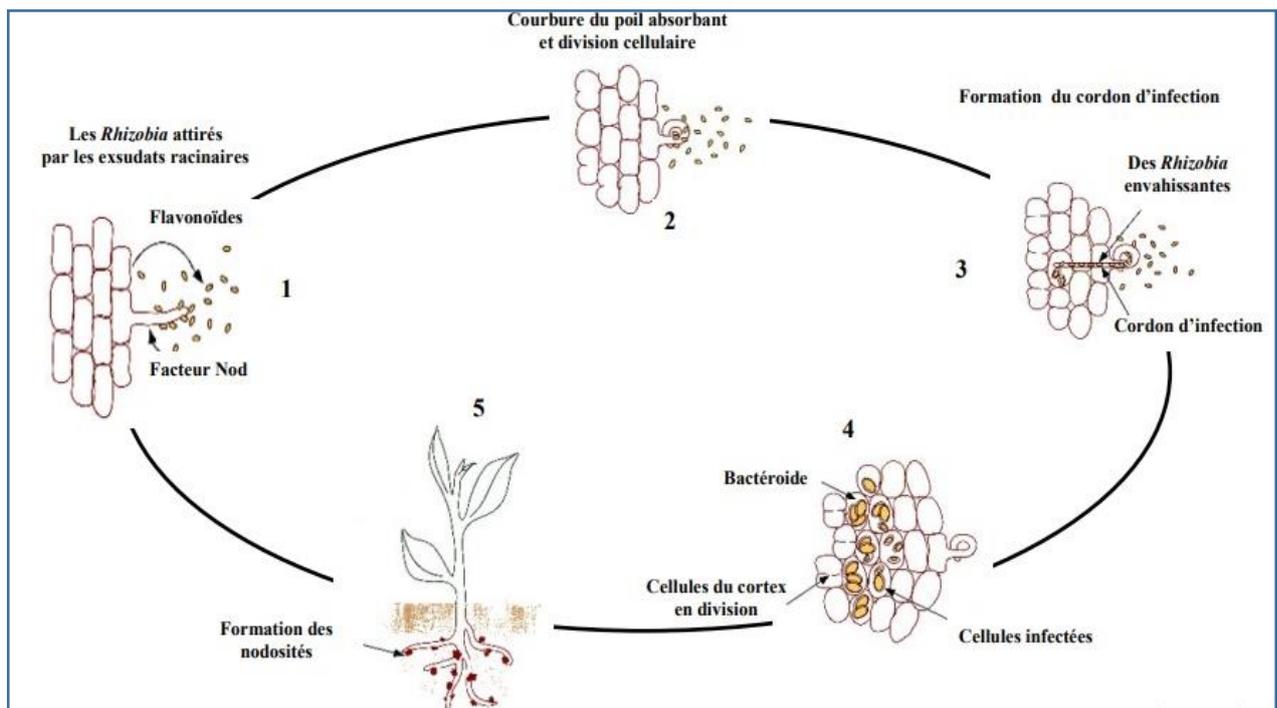


Figure 08 : les principales étapes de la formation des nodosités. (Long et Staskawicz, 1993).

I.2.1. Développement des nodules

La prolifération des bactéroïdes enfermés dans le membrane pér bactéroïdienne et des cellules corticales de la racine produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosité (Davet, 1996 ; Raven et al ; 2007). Le nodule mature se compose de deux parties : les tissus internes, où l'on trouve les cellules infectées par les bactéries et où la fixation d'azote a lieu ; et les tissus externes qui assurent les échanges avec le reste de la plante et la protection des tissus internes. Les tissus périphériques nodulaires sont au nombre de trois : le cortex nodulaire, à l'extérieur, qui dérive de l'épiderme racinaire ; l'endoderme et le parenchyme nodulaire (ou cortex interne) (Hirsch, 1992). Au sein du parenchyme nodulaire se trouvent les traces vasculaires connectées au cylindre central de la racine (Hirsch, 1992). Ces vaisseaux périphériques assurent la nutrition du nodule et permettent l'exportation de l'azote fixé vers le reste de la plante.

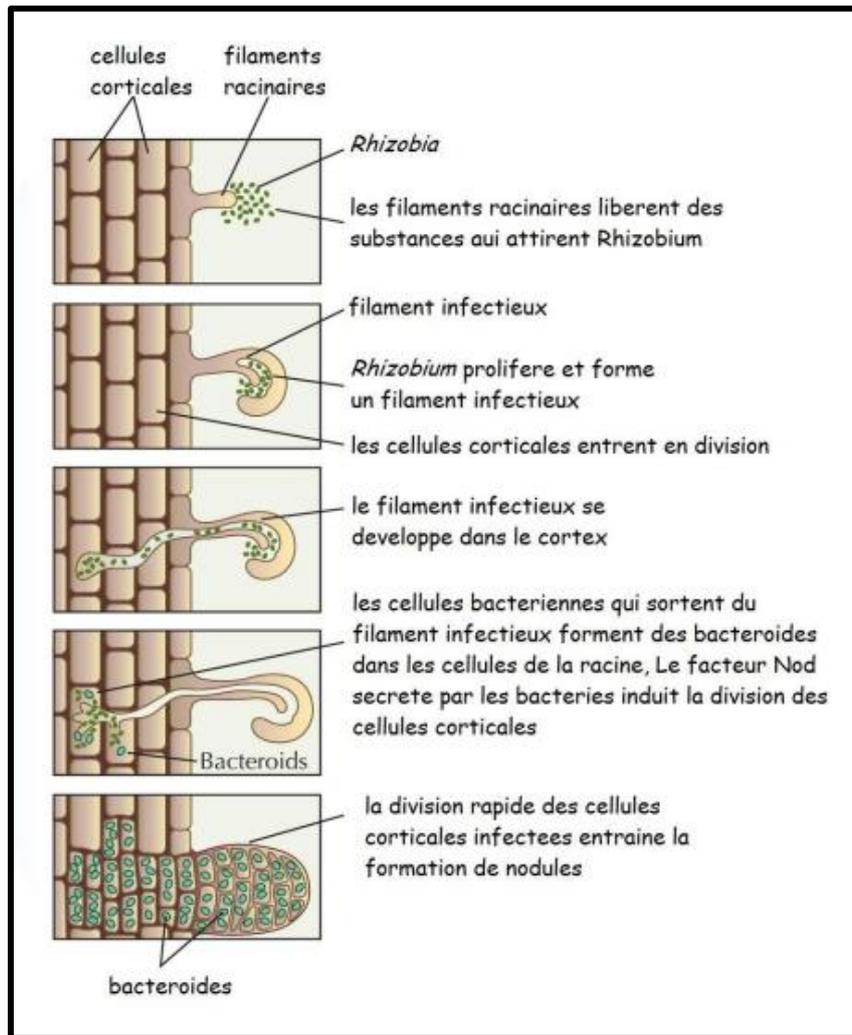


Figure 09 : développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *rhizobium* et une plante (Perry *et al.* 2004)

Dans la famille des légumineuses, la morphologie des nodules et le type de nodosité développée est déterminé par la plante hôte (Dart, 1975 ; Newcomb et al ; 1979 ; Newcomb et Tandom, 1981). Deux types majeurs de nodosités :

- **Les nodules à croissance indéterminés** : retrouvés parmi les espèces des climats tempérés (pois, luzerne, trèfle...), leur type caractérisé par des divisions cellulaires à l'origine du primordium nodulaire ont lieu au niveau du cortex externe.
- **Les nodules à croissance déterminés** : caractéristique des espèces tropicales (soja, haricot...), ces espèces définies par des divisions cellulaires ont lieu au niveau du cortex interne, la zone méristématique qui produit le nodule est persistante (Hirsch, 1992). De ce fait, ces nodules ont une croissance indéfinie, ce qui se traduit par une forme allongée.

Un troisième type intermédiaire a été identifié chez les espèces du genre *Lupinus* et *Sesbania* (*Sesbania rostrata* Brem.). Les divisions cellulaires se font dans le cortex externe ou interne, conduisant à la formation de nodosités déterminées ou indéterminées (Hirsch et al., 2001).

I.2.2. La structure du nodule

Toutes les étapes de développement nodulaire sont présentes au sein d'un même nodule selon un gradient de différenciation, ainsi, le nodule est typiquement divisé en cinq zones (Pawlowski et Bisseling, 1996).

La zone méristématique (I) : située à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries

La zone d'infection (II) (où les bactéries sont libérées) : ou zone de préfixation contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroidienne, et leur différenciation en bactéroides commence. Et leur différenciation en bactéroides commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote

L'interzone (II-III) riche en amyloplastes : dans laquelle la différenciation des bactéroides se poursuit et la fixation de l'azote commence.

La zone de sénescence (IV) : où bactéroides et cellules végétales dégèrent.

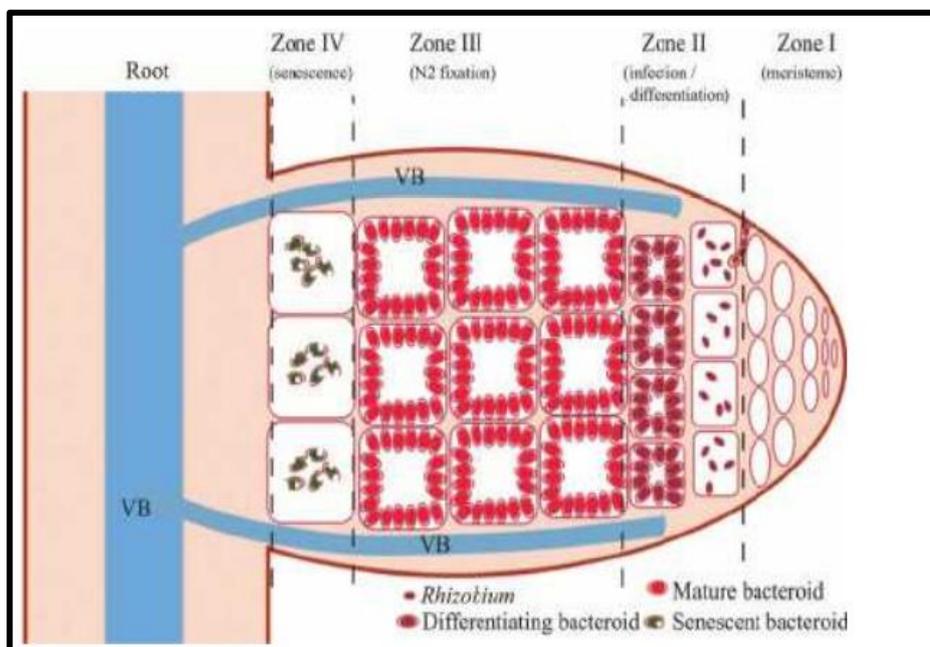


Figure10 : La structure du nodule (site web 6)

I.2.3. Génétique de la Fixation

Pour entamer cette symbiose, on décrit les gènes impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote.

Gène sym : gènes nécessaires à la formation de nodosités symbiotiques fonctionnelles fixant l'azote.

Gène nod : gènes nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités, d'autres gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités : les gènes *nol* et *noe*.

Gène fix : gènes nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote.

Gène nif : gènes codant pour les trois sous-unités hautement conservées de la nitrogénase (réduisant l'azote moléculaire en ammoniac), ainsi que pour des protéines auxiliaires nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Ces gènes symbiotiques sont induits seulement lorsque les bactéroïdes peuvent fixer l'azote, c'est-à-dire quand la bactérie peut noduler la plante. (Dénarié et al, 1996).

I.3. Spécificité d'hôte

La spécificité de l'hôte est l'une des principales caractéristiques de la symbiose entre les deux partenaires. Chaque espèce de *Rhizobium* a un spectre d'hôte étroit, elle ne peut affecter qu'un nombre bien défini d'espèces d'hôte (légumineuses) (Wang et al., 2012). De même, chaque plante hôte (légumineuse) ne peut être affectée qu'avec un nombre d'espèces bactériennes (*Rhizobium*) limité. En contrepartie, certains symbiotes sont capables de noduler un large spectre d'hôte. Ainsi, certaines légumineuses dites à large spectre d'hôte acceptent plusieurs espèces de rhizobia (Doyle and Luckow, 2003).

Le pois (*Pisum sativum* L.) est nodulé par *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* (Riah, 2014). La notion de symbiovar a été introduite pour différencier les bactéries d'une même espèce mais qui possèdent une gamme d'hôte différente. L'espèce *R. leguminosarum* est un des exemples les mieux décrits dans la littérature. Les symbiovars *phaseoli*, *trifolii* et *viciae* nodulent réciproquement les espèces des genres *Phaseolus*, *Trifolium* et *Vicia/Pisum*. Cette distinction en biovars repose sur le spectre d'hôte qui est lui-même lié au type de gènes symbiotiques hébergés par la souche (Jordan, 1984 ; Rogel et al., 2011).

I.4. Intérêt de la symbiose Rhizobienne

Cette symbiose permet aux légumineuses d'être relativement indépendantes vis-à-vis de l'azote du sol, ce qui permet d'assurer leurs besoins. En outre, avec l'ascension des prix des engrais

azotés et au vu des problèmes de pollution par les nitrates, l'importance des légumineuses à forte capacité fixatrice de l'azote devient évidente. Pour les régions où les sols sont généralement pauvres en azote La fixation symbiotique de l'azote est devenue un élément incontournable des politiques de limitation des apports d'engrais azotés que ce soit pour des raisons économiques, écologiques ou de durabilité de l'activité agricole (Alkama et al. 2002 ; Jeder).

Il est donc avantageux de cultiver (Lodwig et al. 2003) les légumineuses car d'une part, elles fournissent des aliments riches en protéines et d'autre part, ce sont des cultures à faible niveau d'intrants que ne modifient que très peu les équilibres biologiques naturels (Sprent, 2001). Cependant ces avantages sont subordonnés à leur capacité de contacter des symbioses fixatrices de l'azote avec des rhizobia des sols destinés à leur culture. Cette capacité ne peut s'exprimer avantagement que si la légumineuse rencontre dans le sol la souche de rhizobia qui est compatible avec elle et qui en même temps présente un pouvoir d'infectivité des racines (une bonne compétitivité vis-à-vis des autres bactéries et une grande efficacité au plan de réduction symbiotique de l'azote atmosphérique) (Graham, 2008).

I.5. Technologie de l'inoculation rhizobienne

Pour économiser les engrais et l'azote du sol, il y aurait intérêt à augmenter la part de la fixation de l'azote et à réduire l'assimilation. Malheureusement, lorsque la plante a à sa disposition les deux sources d'azote NO_3^- et N_2 , elle choisit préférentiellement le NO_3^- et la fixation est réduite. L'apport d'engrais azoté réduit la fixation d'azote, chez certaines plantes comme le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et l'arachide (*Arachide hypogaea*). L'apport d'engrais augmente le rendement, chez d'autres telles le soja (*Glycine max*) et la luzerne (*Medicago Sativa*) et l'influence sur le rendement est faible ou nulle (FAO, 1992).

La capacité de fixation symbiotique de l'azote des légumineuses peut être améliorée en inoculant le sol avec des souches performantes de *rhizobia*.

Les sols peuvent varier considérablement en termes de nombre et de la nature des populations de *rhizobium*. Ainsi l'on remarque que ces populations peuvent être composées de plusieurs espèces, qui montrent une gamme diverse de l'efficacité symbiotique avec la légumineuse hôte (Bergersen, 1970, et Gibson et al, 1975). Le nombre de *Rhizobia* dans le sol peut être déterminé par des facteurs physicochimiques et biologiques (Lowendorf, 1980). 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.

I.5.1. Généralités sur les inoculums

Dans les situations où l'inoculation d'une légumineuse s'avère nécessaire (l'introduction d'une culture nouvelle, pour la colonisation de terre où le *rhizobium* spécifique est absent, et où les conditions écologiques sont défavorables à la survie des *Rhizobia* dans le sol) la fabrication sur place présente l'avantage, si elle est faite en s'entourant de mesures de vérification de la qualité du produit, de fournir un inoculum adapté aux conditions rencontrées localement (FAO, 1992). 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 N₂ et une résistance aux antibiotiques (FAO, 1989). Le premier bio-engrais à base de *Rhizobia*, disponible commercialement, a été le Nitragin aux Etats-Unis d'Amérique en 1895 (site web 4).

I.5.2. Définition d'un inoculum

Lorsque le sol ne contient pas naturellement les *Rhizobia* spécifiques fixateurs de la légumineuse que l'on veut introduire, il est indispensable d'apporter la souche bactérienne nécessaire. Cette opération appelée injustement « inoculation », il serait préférable de parler de « bactérisation » selon les auteurs consultés, et qui est facilement réalisée au semis en mettant les *Rhizobia* (sous forme d'inoculum) soit sur la graine, soit dans la raie de semis (Obaton.M ; FAO, et 1989).

Les inoculums sont aussi connus sous le nom de Bio-engrais (capable de fixer l'azote) ; terme général utilisé pour les produits (liquide ou sur support solide) contenant des microorganismes qui peuvent être seuls ou mélangés, et permettent de fixer l'azote atmosphérique, « Bio » signifie vivant et « engrais » un support capable de former des éléments nutritifs sous forme utilisable.

I.5.3. Critères de sélection d'un inoculum

Basés sur les suggestions de Brockwell (1982) et de Kannaiyan et al. (2000), les caractères suivants sont considérés comme souhaitables pour une souche afin d'être utilisée comme un inoculum :

- a) capacité à noduler et à fixer l'azote.
- b) capacité à former des nodules avec une population native de *Rhizobium* présente dans le sol.
- c) capacité à fixer l'azote malgré les mauvaises conditions environnementales.
- d) capacité à former des nodules et à fixer l'azote en présence de nitrates dans le sol.

e) capacité à bien pousser dans un milieu artificiel, sur un support d'inoculum et dans le sol.

f) capacité à persister dans le sol, particulièrement pour les légumineuses annuelles.

g) capacité à migrer du site d'inoculation.

h) capacité à coloniser le sol en l'absence de légumineuse hôte.

i) capacité à tolérer les stress environnementaux.

j) capacité à fixer l'azote sur un large spectre de génotypes.

k) être stable génétiquement.

l) être compatible avec des fertilisants chimiques.

I.5.4. Caractéristique d'un bon inoculum

L'inoculum doit contenir un nombre élevé de bactéries vivantes spécifiques de la légumineuse à cultiver (Vincent, 1970). Des inoculums contenant au moins un milliard de bactéries par gramme de produits frais sont aisément réalisables par les industriels mais il est important que, lors du transport et de la conservation, l'inoculum ne soit pas exposé à plus de 30 °C -35°C.

(Site web 4).

La bactérie doit être spécifique de la plante considérée, c'est-à-dire non seulement appartenir au groupe de rhizobiums correspondants, par exemple *sinorhizobium meliloti* pour la luzerne, *Bradyrhizobium japonicum* pour le soja, mais il est nécessaire que la souche forme des nodosités très fixatrices sur l'espèce ou la variété cultivée. C'est pourquoi, pour choisir l'inoculum voulu, il est souhaitable de demander l'avis d'un laboratoire de microbiologie (FAO, 1989).

I.5.5. Conservation et emploi de l'inoculum

L'inoculum est un produit biologique vivant qui peut être stocké et utilisé comme un engrais inerte; il est nécessaire de prendre donc certaines précautions pour sa conservation et son emploi -conservation de l'inoculum dans un endroit frais avant utilisation (4°C si possible mais ne jamais dépasser 30°C)

-au moment de l'inoculation : travailler dans un local frais, à l'abri du soleil. Le matériel utilisé doit être propre. Après inoculation des graines, le semis doit être rapide et effectué à l'abri des rayons solaires directs.

Il faut bien lire l'étiquette qui précise le mode d'emploi de l'inoculum et la date limite d'utilisation.

I.5.6. Les contrôles de qualité d'un inoculum

Le contrôle de la qualité d'un inoculum destiné à la culture d'une légumineuse nous amène à

vérifier s'il y a un nombre suffisant de rhizobiums vivants dans les sachets (minimum 10^8 par gramme) pour assurer au moment de l'enrobage des semences, au moins 1000 *Rhizobia* vivants pour une petite graine (luzerne, trèfle) et 10^5 à 10^6 pour une grosse graine comme celles du soja, arachide, haricot selon Thomson (1980) et Vincent (1970).

Pour mesurer la qualité de l'inoculum, l'on procède au dénombrement et contrôler l'infectivité (capacité à former des nodosités sur les racines de la légumineuse à cultiver) de la souche présente dans l'inoculum.

Diverses techniques sont utilisées pour le dénombrement des *Rhizobia* (Tableau 4), et les plus utilisées sont :

- Le comptage sur lame.
- La mesure de la densité optique.
- Le dénombrement par dilution et étalement sur boîte de pétrie.
- Le dénombrement par la technique d'infection des plantes.
- Le dénombrement par immunofluorescence sur filtre.
- Le dénombrement par la technique ELISA.

I.5.7. Mode d'action d'un inoculum

Les inoculums peuvent agir de plusieurs manières :

a) action directe : les microorganismes infestent les poils des racelles des plantes et font gonfler les cellules racinaires, qui forment des nodosités. A l'intérieur de ces nodosités, les bactéries convertissent l'azote de l'air en une forme que la plante peut utiliser comme nutriment.

b) Action indirecte : les inoculums convertissent des formes minérales de phosphate tellurique et autres éléments nutritifs moins disponibles en des formes immédiatement disponibles pour les plantes.

c) Protection : les inoculums offrent une protection contre les agents pathogènes (Anonyme i, 2001).

I.5.8. Les buts de l'inoculum

Les inoculums sont utilisés pour :

- Stimuler les racines et améliorer la croissance.
- Faire germer les racines.
- Apporter des facteurs de croissance et des éléments nutritifs.
- Lutter contre les maladies et les prévenir.

- Améliorer ou rétablir la microflore du sol. (Anonyme i, 2001).

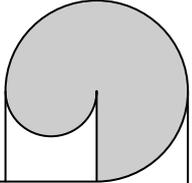
I.5.9. Nécessité d'une inoculation

L'inoculation des légumineuses est un moyen de s'assurer que la souche de *rhizobia* la plus adaptée, et en nombre suffisant, soit présente dans la rhizosphère et permette une nodulation abondante alliée à une bonne fixation d'azote. Malgré les difficultés qui peuvent survenir pendant l'inoculation des légumineuses, sa pratique est simple. Le but de cette manœuvre est d'assurer une fixation élevée d'azote (Date., 2000).

I.5.10. Cas de déficience en rhizobia

Il est nécessaire d'inoculer les graines ou le sol avec des bactéries hautement effectives dans les cas suivants :

- Sols qui n'ont pas été des hôtes pour les légumineuses (sols vierges).
- Un sol qui n'a pas reçu la légumineuse spécifique depuis plus de 4 ans.
- Un pH du sol supérieur à 8.5 (Un pH de sol inférieur à 5.8 doit être ajusté en ajoutant de la chaux avant l'inoculation).
- Matière organique du sol inférieure à 1%.
- Sécheresse ou inondation.
- Erosion du sol.
- Utilisation des traitements et produits chimiques.
- Température des couches de sols dépassant 45°C. (Anonyme j. 2004).



CHAPITRE 2 :

Matériel et Méthodes

II.1. Etat de lieu, prospections et choix de l'agroécosystème :

Afin de bien cadrer le sujet, une étude préliminaire et des enquêtes sur le terrain sont effectuées en débutant par le choix de l'agroécosystème.

L'échantillonnage de plante de pois qui a été effectué au niveau de la ferme agricole GUERROUDJ Elhadj (Latitude 34°52'32.7" Nord Longitude 000°18'00.2" Est), le 20-03-2022 pour faire l'isolement de *Rhizobium*. (Photographie 02)



Photographie 02 : Zone de prélèvement de *Pisum sativum* (la ferme agricole GUERROUDJ Elhadj le 20-03-2022 Saida).

II.2. Méthodologie suivi pour l'étude des *Rhizobium*

II.2.1. Isolement des rhizobia à partir des nodosités récoltées *in-natura* :

II.2.1.1. Collecte des nodules :

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars et Avril quand la terre est sec, à cette période de l'année les nodules sont bien développées et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui indique la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote. La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck et al, 1993). Une creusée

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

d'environ 15cm au tour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire ; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ; couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire. (Photographie 03)



Photographie 03 : la collecte des nodules

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachés à 1 à 2 mm du site d'attache, en fin séchées avec du papier filtre avant leur conservation.



Photographie 04 : Le rinçage des racines.

II.2.1.2. Conservation des nodules

La méthode de conservation utilisée est celle décrite par Vincent (1970) qui repose sur la dessiccation des nodules dans des flacons adéquats contenant du Chlorure de Calcium anhydre (CaCl_2) (Figure 14). Par cette méthode les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois. Chaque flacon sera identifié par une étiquette portant les informations suivantes :

- Le nom de la plante hôte,
- Le lieu et date de prélèvement ;
- La date de conservation.
- Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h.

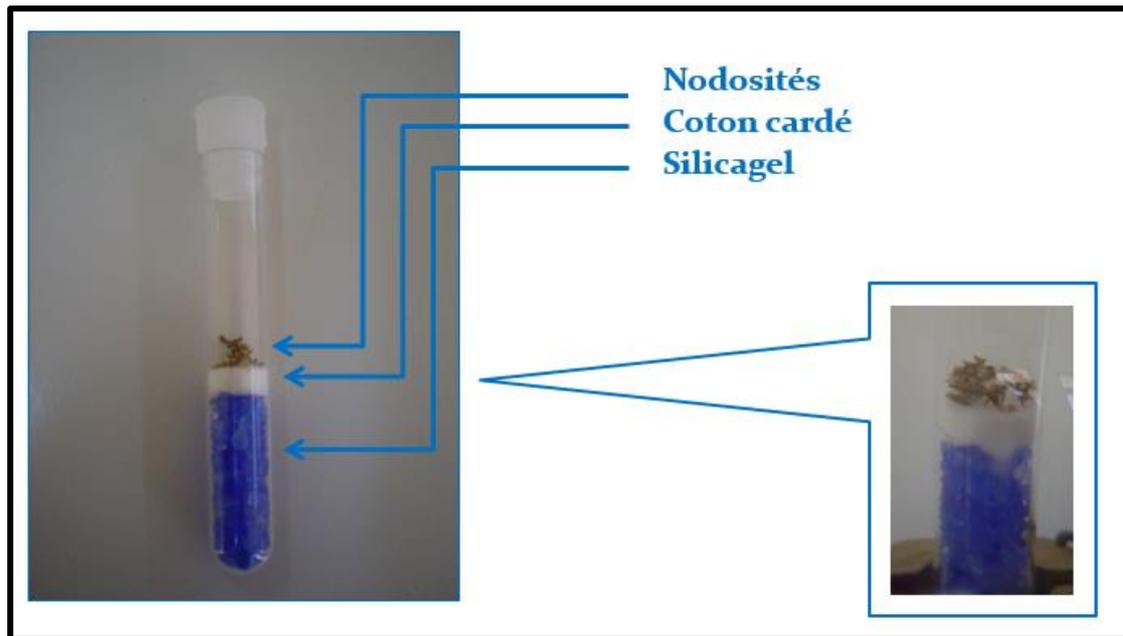


Figure11 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

II.2.1.3. Isolement et purification des isolats bactériens :

✓ Isolement de souches de rhizobium :

L'isolement a été réalisé selon la technique classique d'isolement de souches de rhizobium à partir des nodosités (Vincent, 1970) :

Les nodosités fraîches ont été lavées à l'eau courante pour éliminer les plus grosses particules de sol, puis séchées entre deux papiers filtre. Pour les nodosités conservées dans le glycérol, nous avons procédé à un lavage avec de l'eau distillée et puis séchage sur papier filtre.

Une immersion très brève des nodosités (5-10 secondes) dans de l'éthanol 95%, puis dans une solution de chlorure mercurique à 0.1 % pendant 3 minutes est réalisée pour désinfecter la surface des nodosités.

La désinfection est suivie par un rinçage abondant avec de l'eau distillée ; rinçage rapide de chaque nodosité 5 fois, puis nous avons effectué trois nouveaux rinçages en laissant les nodosités au moins 15 minutes dans chaque récipient pour éliminer toute trace de HgCl_2 .

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Une nodosité désinfectée est ensuite écrasée aseptiquement à l'aide d'une pince flambée à l'alcool, dans une boîte de Pétri₂ contenant le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Annexe 1), et incubation dans des boîtes de pétri à 28°C.

Toutes les opérations ont été effectuées près d'une flamme dans une enceinte stérile (hôte à flux laminaire). (Figure 15)

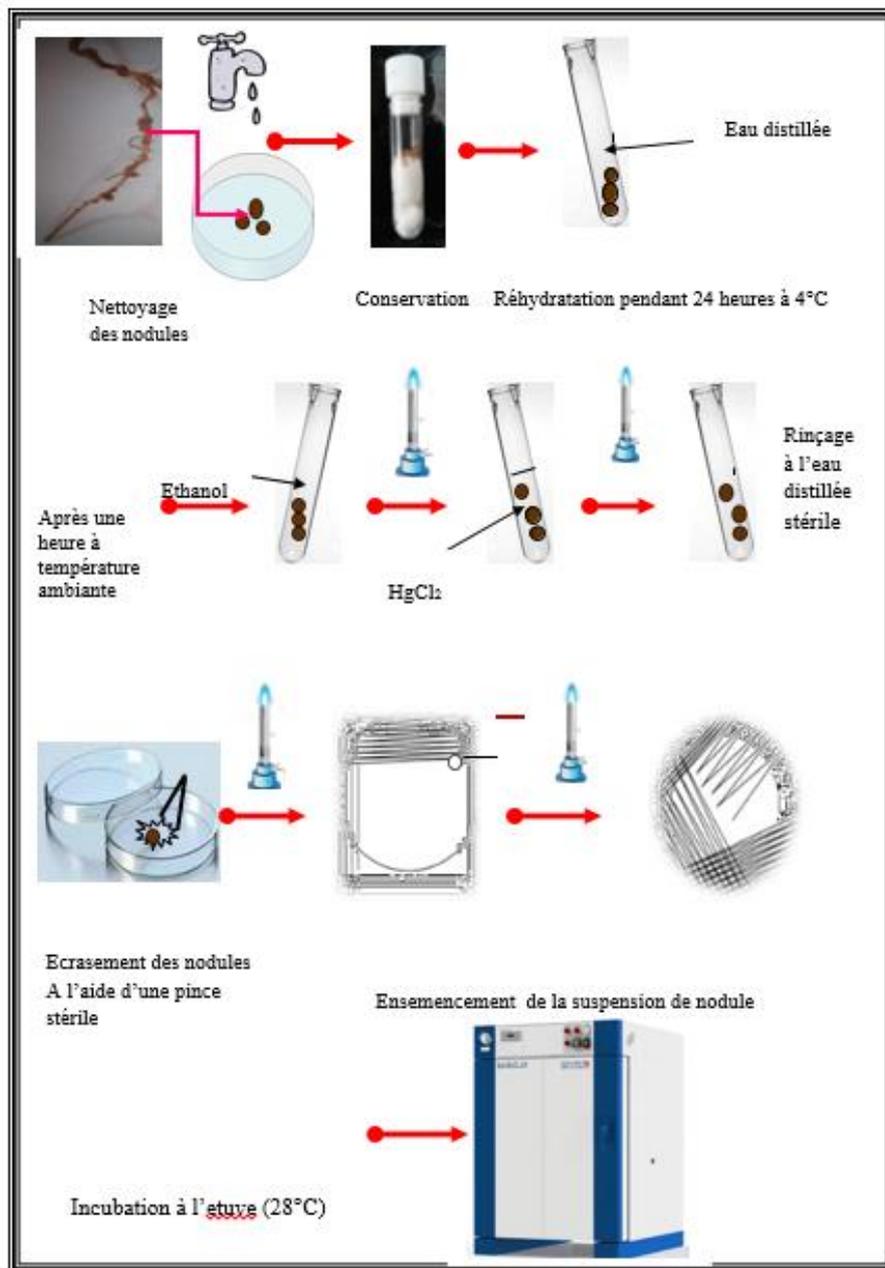


Figure 12 : Méthode de stérilisation et l'isolement selon la méthode des nodules écrasés.

✓ **Purification des souches :**

Quand les colonies apparaissent, nous les avons repiqués sur une nouvelle boîte de pétri (milieu YEM) par stries successifs. Une colonie bien isolée est ensuite repiquée sur le milieu YEM gélosé et incubée à 28°C pendant 48 à 72 h.

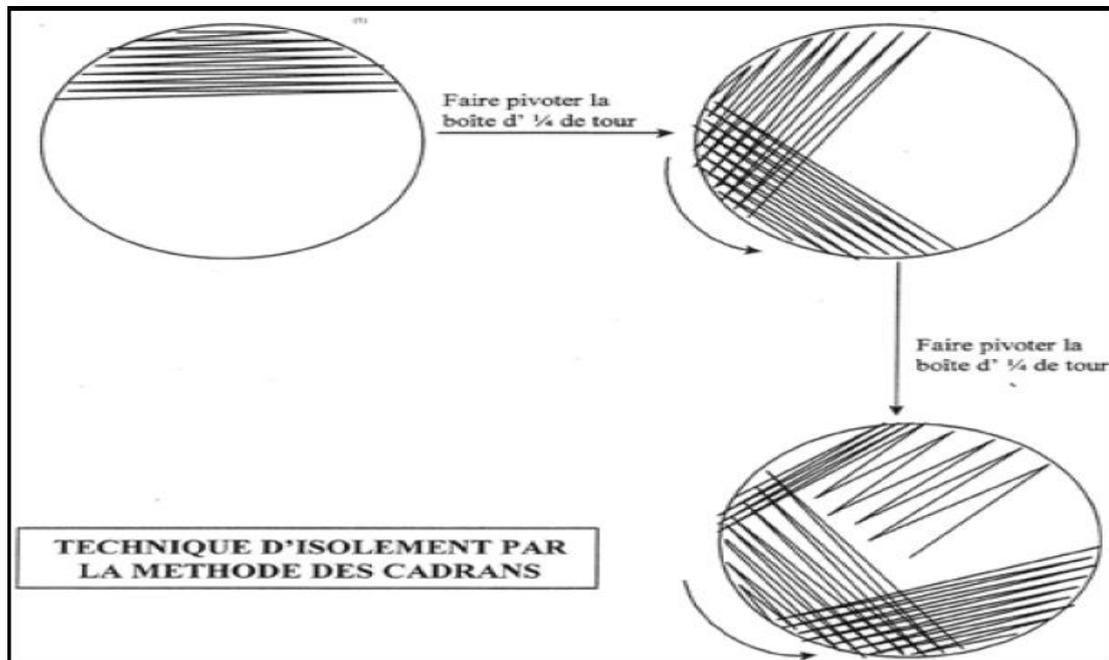


Figure13 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

II.3. Conservation des souches

Les isolats purifiés sont conservés selon les deux procédés :

- ✓ Pour une courte durée, nous les repiquons sur le milieu YEM incliné ; en effectuant des stries régulières sur la surface de leur gélose (figure 12). Après 48h à 5 jours d'incubation selon l'isolat, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4°C, à raison de plusieurs exemplaires par souche selon la méthode de Vincent, (1970). Des repiquages réguliers sont réalisés tous les 6 mois.

- ✓ Pour une conservation de longue de durée (jusqu'à 2 ans), les cultures d'isolats ont été transférées dans des cryotubes à raison de 0.750ml de suspension bactérienne de *rhizobium* en phase exponentielle additionné de 0.750ml de glycérol (50% v/v). Le mélange homogénéisé a été conservé à -12 °C . Dans des conditions optimales, une conservation à -80°C est recommandée.

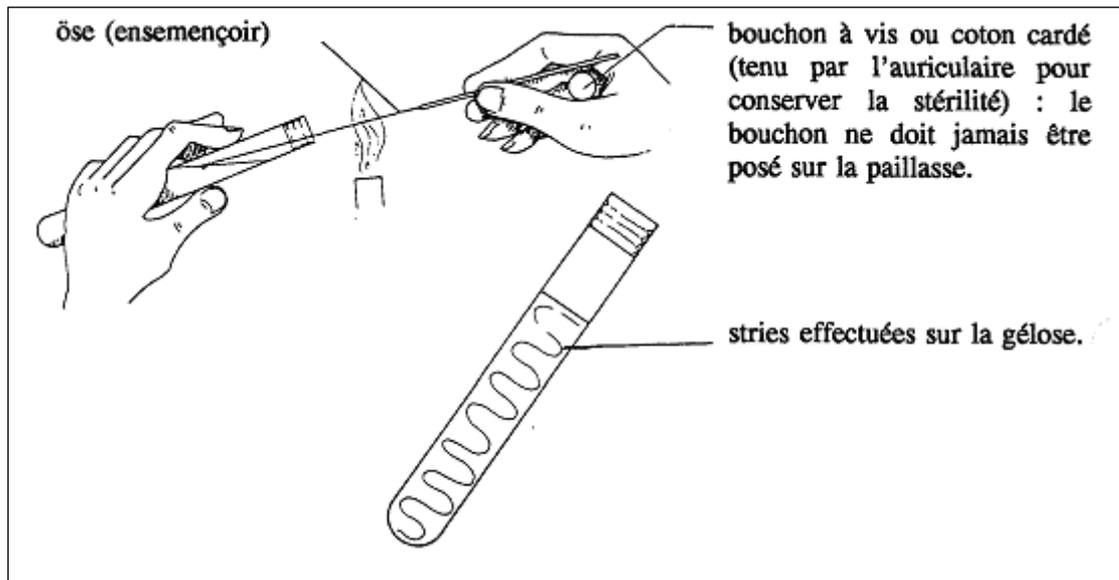


Figure 14 : Repiquage sur tube gélose incliné d'après Vincent (1970).

III. Caractéristiques morphologiques, culturaux et physiologiques des isolats

III.1. Caractères morphologiques

III.1.1. Observation macroscopique :

L'étude des caractères morphologiques (macroscopiques) consiste en l'observation des colonies bactériennes, à l'œil nu ou grâce à la loupe binoculaire, prenant en compte les éléments d'identifications macroscopiques suivant : (Zahid et al., 2015).

- La taille des colonies : moyenne, ou grosse...
- La chromogénèse : couleur de la colonie.
- La forme des colonies : rondes, irrégulières, etc.
- L'élévation : convexe, concave, ou plate.
- L'opacité : opaque, translucide, ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, ou dentelée.

III.1.2. Observation microscopique :

✓ Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de les classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites (Gram +) et bactéries dites (Gram -) (Annexe 3)

III.2. Test physiologique

III .2.1. Effet de température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimale de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et YMB et incubés à différentes températures : 4°C, 20°C ,28°C,30°C, 37°C,40°C, 45°C.

Les lectures sont effectuées après 24 à 72 heures d'incubation pour les souches qui ont une croissance rapide et la lecture pour les souches qui ont une croissance lente dure à 6 jours. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

IV. Etude des paramètres symbiotiques

IV.1. Test d'infectivité des souches

Le but de ce test est d'identifier les souches et évaluer leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970, Beck et al., 1993).

Ce test consiste en l'inoculation des graines germées de la plante hôte (*Pisum sativum* L.) avec les différents isolats. Pour réaliser ce test les étapes suivantes été effectuées :

IV.2. Désinfection et germination des graines

Dans notre travail nous avons préféré la méthode qui consiste à désinfecter la surface des graines avec l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 7 minutes qui nous paraît plus ou moins efficace en l'absence d'autres produits de désinfection et la plus utilisée. Les graines sont ensuite rincées 15 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toutes traces d'hypochlorit . Les graines ont été immergées dans la dernière eau de rinçage pour leur imbibition et aussi pour éliminer les graines infertiles (flottantes), tout le processus a été effectué sous hotte à flux laminair.

Les graine ainsi traitées ont été mises à germer aseptiquement dans l'eau gélosée à 1% (Annexe 2) dans des boites de Pétri et incubées à l'obscurité, à température ambiante

pendant 2 – 3 jours.



Photographie 05 : Désinfection la germination des graines.

IV.3. Mise en place des plantules et inoculation

Après germination des graines, l'ensemble des plantules obtenues dont les radicules ne dépassent pas 2 cm sont transférées aseptiquement dans des tubes à essai recouverts de papier aluminium stérilisés dans l'autoclave, puis remplis de solution nutritive de Bertrand ;1997 additionnée de CaCO_3 à 1% (annexe4) ; et pourvus de deux trous servant pour le repiquage, l'arrosage ou l'inoculation des plantules.

Le test est réalisé à raison de 4 tubes pour chaque souche et un tube témoin rempli de solution nutritive dépourvue d'azote. Après deux jours de leur mise en culture, les jeunes plants sont inoculés avec 5 ml de la suspension bactérienne liquide ($\sim 10^7$ cellules) des cellules jeunes de chaque souche retenue après 48 h d'incubation .

Les tubes sont recouverts afin de maintenir les racines à l'obscurité et placées par la suite dans une chambre de culture (température ambiante, photopériode 10 heures d'obscurité - 14 heures de lumière). Toutes les plantes sont arrosées aseptiquement par la solution nutritive stérile et l'eau distillée stérile tous les deux jours alternativement pour compenser la quantité d'eau perdue lors de la transpiration de la plante.

IV.4. Inoculation des plantules *in Vitro*

L'inoculum est préparé par l'introduction d'une colonie pure dans un tube contenant milieu YEM liquide, puis incubé à 28°C et agités pour assurer l'aération de la souche. La concentration des isolats testés, après l'incubation de 48 h correspond à la turbidité du tube N° 0,5 de Mc Farland. (Annexe 5)

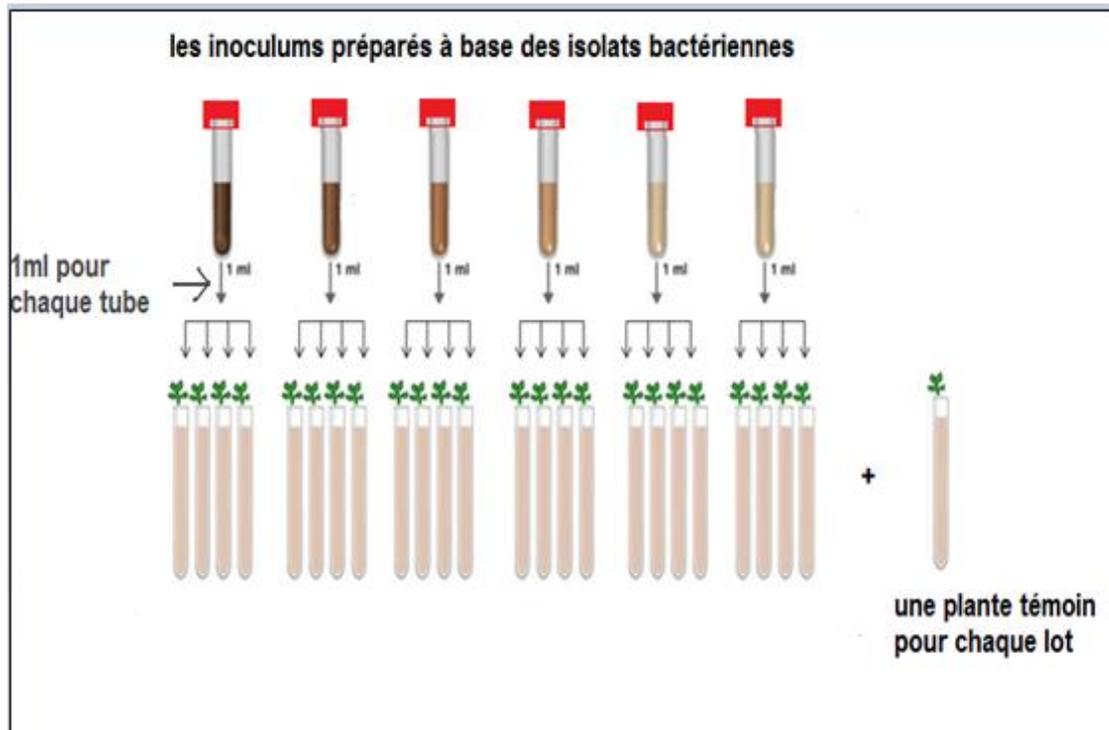
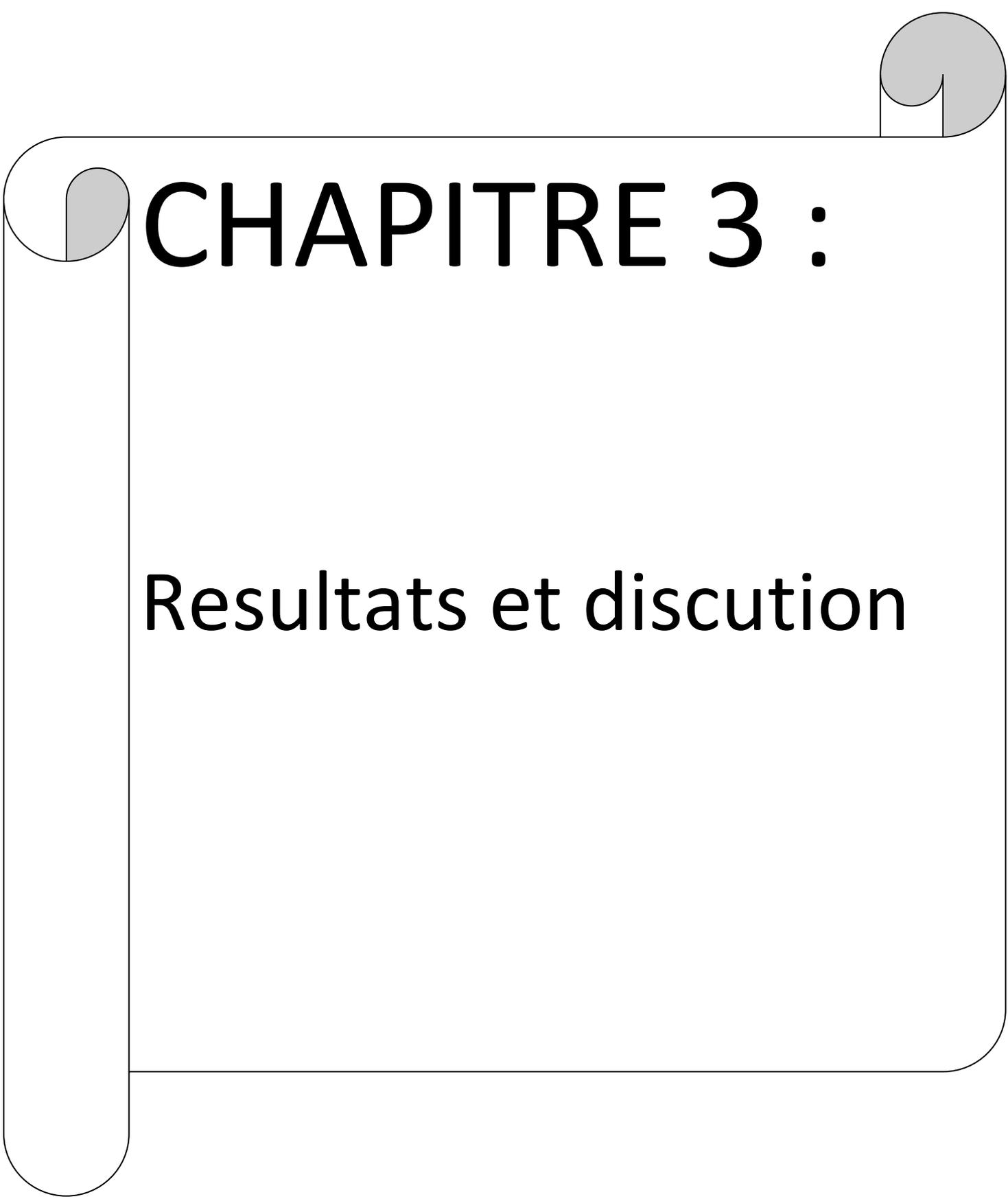


Figure 15 : Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisés *in-vitro*.

IV.5. 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 (parties racinaires et aériennes) en comparaison aux plantes non inoculées (témoin) dans les mêmes conditions de cultures et déterminer leur couleur et leur forme.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and rounded corners. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curving upwards. The unrolled portion is white, while the rolled-up parts are shaded in light gray. The text is centered on the white portion of the scroll.

CHAPITRE 3 :

Resultats et discussion

III.1. Constitution d'une collection des Rhizobia

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires récoltés *in natura* en période de floraison (mois de Mars) ; nous a permis d'obtenir une collection de 10 isolats issus de *Pisum sativum* prélevée de la zone semi-aride de Ouest Algérien (domaine BOUHRIT Hasasna Saida).

Tableau 02 : isolats bactériens obtenus à partir de nodules dans la zone semi-aride (domaine BOUHRIT Hasasna Saida).

Souches	Origine géographique	Plante d'isolement	Date d'isolement
AQ 1	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 2	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 3	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 4	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 5	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 6	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 7	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
AQ 10	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
BAA 1	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022
BAA 4	Hasasna Saida	<i>Pisum sativum</i>	20-03-2022

III.1.1. Caractéristiques morphologiques, et physiologiques des isolats

III.1.1.1. Etude macroscopique :

Sur milieu YEM solide ; Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur milieu YEM. Les colonies sont d'une couleur blanchâtre ou crème, d'un diamètre qui varie entre 2 et 4 mm, sous forme ronde avec un contour régulier, une surface semi bombée et lisse. Elles sont translucides, visqueuses et brillantes, avec une texture homogène.

Sur milieu YEM liquide ; Sur milieu liquide, l'obtention du trouble commence après trois jours pour la majorité des bactéries nodulaires utilisées.

Les 10 isolats purifiés, isolés des nodosités des *Pisum sativum* présentent 3 aspects macroscopiques :

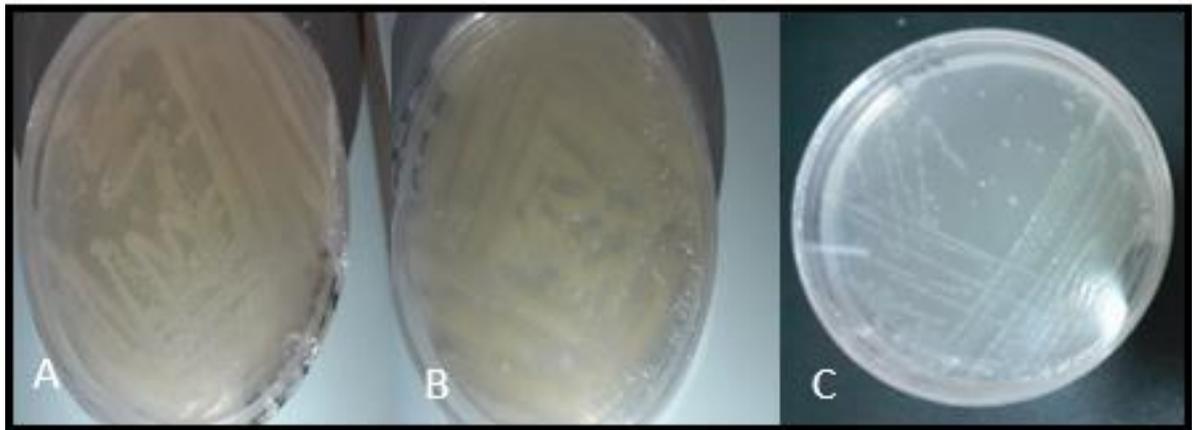
Chapitre 3 Résultats et discussion

Les isolats :**AQ 1, AQ 4, AQ 5, AQ 10, BAA 1** : sont bombées, blanchâtres, compactes à contour régulier et se caractérisent par une forte viscosité.

Les isolats :**AQ 2, AQ 7, BAA 4** : les colonies obtenues sont circulaires, beiges, bombées, à contour régulier de surface lisse et visqueuse

. Les isolats :**AQ 3, AQ6** : sont de couleur jaune à contour régulier.

Cette description est valable pour la grande majorité des colonies, et ceci correspond à la description des rhizobia par Jordan (1984). Photographie 12



Photographie 06 : Aspect morphologique des isolats après **72 h** d'incubation à **28 °C**. **A** : Aspect de l'isolat **AQ 4** **B** : Aspect de l'isolat **AQ 2** **C** : Aspect de l'isolat **AQ 6**.

Tableau 03 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats

Souches	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques	Temps d'incubation	
			24 h	48 h
AQ 1	Colonies rondes à bords réguliers avec un diamètre de 2 à 4 mm, plate, lisse, de couleur blanche, brillante, translucides, ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, de couleur rose, et de petite taille.	++	++++
	Colonies de forme régulière avec un	Bacilles Gram négatif, roses, à		

Chapitre 3 Résultats et discussion

AQ 2	diamètre de 4 mm, bambées, lisse, de couleur beige, brillante, ayant une consistance crémeuse.	bouts ronds et de taille moyenne.	+++	++++
AQ 3	Colonies de forme irrégulière avec un diamètre de 2 à 3 mm, plate, rugueuse, de couleur jaune , brillante ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, roses, à bouts ronds et de taille moyenne.	+++	++++
AQ 4	Colonies rondes, avec un diamètre de 2 à 3 mm, bambée , de couleur blanchâtre, brillante, translucide, ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, de couleur rose .	+++	++++
AQ 5	Colonies rondes, avec un diamètre de 1 à 2 mm, bambée, de couleur blanchâtre, brillante, translucide, ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, roses .	++	++++
AQ 6	Colonies de forme irrégulière avec un diamètre de 3 à 4 mm, plate, rugueuse, de couleur jaune , brillante ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, de couleur rose .	+++	++++
AQ 7	Colonies de forme régulière avec un diamètre de 5 mm, bambées, lisse, de	Bacilles Gram négatif, de couleur rose .	+++	++++

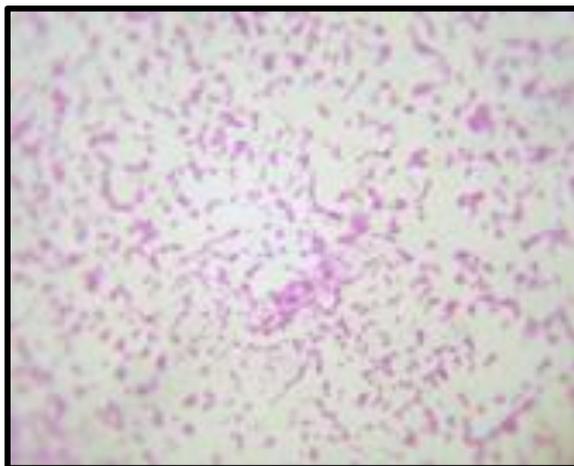
	couleur beige, brillante, ayant une consistance crémeuse.			
AQ 10	Colonies rondes, avec un diamètre de 2 à 3 mm, plate, de couleur blanchâtre, brillante, translucide, ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, roses, à bouts ronds et de taille moyenne.	++	++++
BAA 1	Colonies circulaire réguliers avec un diamètre de 2 à 4 mm, bambée, lisse, de couleur blanchâtre, brillante, translucides, ayant une consistance crémeuse.	Bacilles Gram négatif, de couleur rose, et de petite taille.	++	++++
BAA 4	Colonies circulaire de forme régulière avec un diamètre de 3 mm, bambées, lisse, de couleur beige, brillante.	Bacilles Gram négatif, de couleur rose.	+++	+++ +

++++: Très bonne croissance +++: Bonne croissance ++: Faible croissance

III.1.1.2. Etude microscopique

La coloration de Gram et l'observation microscopique révèlent que les souches étudiées AQ 1 ; AQ 2 ; AQ 3 ; AQ 4 ; AQ 5 ; AQ 6 ; AQ 7 ; AQ 10 ; BAA 1 ; BAA 4 sont des bactéries sous forme des courts bacilles à Gram négatifs (couleur rose).

Vincent (1970) ; Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1985) rapportent que les rhizobia sont des bactéries à Gram négatif de forme des bacilles. (Photographie 13).



Photographie 07 : Observation microscopique des bactéries x 100

Nos résultats sont en accord avec ceux de Getaneh (2008) et Zerihum (2006) qui ont observé des caractéristiques similaires de rhizobium isolés de la féverole.

III.1.1.3. Etude physiologique

III.1.1. 3.1. Effet de la température

Les résultats de l'étude de la température sur le milieu YEM solide et sur YEM liquide sont présentés dans le **tableau 04**. Après **72 heures** d'incubation on n'observe aucune croissance à 4°C. Ceci a été souligné par Jordan (1984), qui a constaté que la croissance des rhizobia est très rare à cette température. Tous les isolats présentent une meilleure croissance à 28 °C (Photographie 15 b), ceci a été souligné par Graham (1992) qui a rapporté que la température optimale de croissance est située entre 28°C et 31°C. Une faible croissance sur les isolats poussés à 37 °C et 45 °C.

Tableau 04 : Croissance des souches sur milieu YEM solide et liquide dans des différentes température pendant **48 à 72 h**

Souches		BAA1	BAA4	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ5	AQ6	AQ7	AQ10
Températures											
4°C	liquide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	solide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20°C	liquide	±	++	±	±	-	++	±	±	±	-
	solide	-	++	±	±	-	++	±	±	±	-
28°C	liquide	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	solide	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Chapitre 3 Résultats et discussion

37°C	liquide	++	±	++	±	-	±	-	++	++	-
	solide	++	±	-	±	-	±	-	++	++	-
40°C	liquide	-	-	±	++	±	++	-	±	±	++
	solide	-	-	++	++	±	-	-	-	±	++
45°C	liquide	++	±	-	++	-	-	++	±	±	-
	solide	-	±	-	++	-	-	++	++	±	-

- : aucune croissance

++ : bonne croissance

± : faible croissance

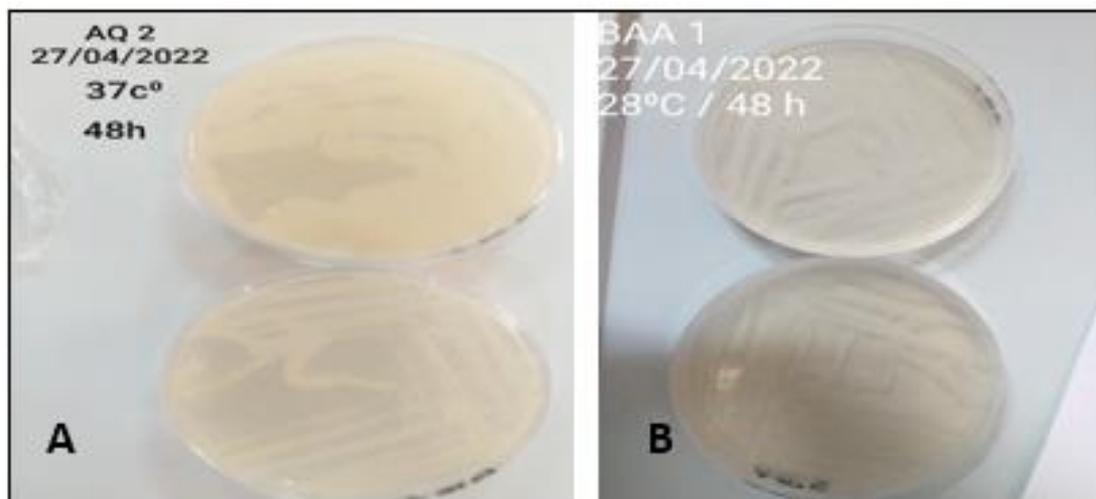
++++ : très bonne croissance

La plupart de nos isolats sont capables de croître à une température allant de 28°C jusqu'à 45°C ; la croissance optimale a été notée avec les températures 28°C après 48 heures et 37°C mais pour cette dernière il y a eu croissance après trois jours d'incubation pour toutes les souches ; pour la température 4°C on n'observe aucune croissance, et nous terminons avec la température 45°C où nous constatons que les souches, **AQ 7, BAA 4** avaient une croissance faible, pour les cinq souches

AQ 1, AQ 3, AQ 4, AQ 10, BAA 1, nous avons constaté l'absence totale de croissance et pour les souches **AQ 2, AQ 5, AQ 6**, a donné une bonne croissance après 3 jours d'incubation, Ce qui indique que nos isolats sont thermo-tolérants. (Tableau 4).

Graham (1992) a rapporté que les rhisobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C. Toutefois, il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques (Lipsanen et Lindström, 1989) ou bien celles isolées dans l'environnement chaud et sec de la savane du sahel en Afrique et qui peuvent tolérer des températures au-delà de 40°C (Karanja et Wood, 1988).

Les souches isolées par Diouf et al. (2000) résistent à des températures très élevées de 40°C à 44°C. Razaneen et al. (2002) déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistance est probablement reliée à la capacité des bactéries de survivre dans des périodes chaudes.



Photographie 08 : Croissance des souches sur milieu **YEM solide** dans des différentes températures pendant **48 h**

III.1.2. Etude symbiotique

La mise en évidence de l'association symbiotique, entre la plante hôte et le microsymbionte qui est une relation spécifique. Cette propriété est limitée à un groupe spécifique de rhizobium et l'hôte sur lequel infection est induite (Beck, 1993).

Dans notre étude, nous avons testées les isolats AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4. Pour évaluer la capacité de la formation des nodules sur les racines de leur plante hôte (infectivité) (Beck, 1993), sous des conditions bactériologiques contrôlées en respectant des conditions d'asepsie totale lors de l'inoculation. Tant dis que le pouvoir efficient des isolats est repéré par l'état de développement de la partie aérienne de chaque pied de plante hôte.

À partir des résultats de ce test, nous avons constaté que la plupart des souches isolées (9/10) ont formé des nodules fixateurs rougeâtres sur les racines de pois et ont été répertorié : AQ1, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4.

Le temps d'apparition des premiers nodules sur les racine est différent entre les neuf isolats ; la souche AQ4, forme des nodules après 27 jours, et après Cinq semaines pour les autres souches, AQ1, AQ3, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4.



Photographie 09 : Croissance *in vitro* des plantes de *Pisum sativum* inoculées avec les isolats bactériens.

Dans cette expérience, Les plantes (*Pisum sativum*) inoculées par les souches AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4, ont eu la meilleure augmentation significative de la hauteur et du diamètre des plantes ; la partie aérienne est développée avec de grande nombre des feuilles vertes et de taille importants, la partie racinaire présente stimulation. (Photographie 17).

III.1.2.1. Analyse phénotype des nodules

L'efficacité d'une symbiose est déterminée à partir de la taille, la couleur et le nombre des nodosités (VILIN, 1999). Les nodules observés sur le système racinaire sont de type indéterminé indiquant la présence d'une zone méristématique à croissance continue (Vasse et al., 1990). Ils sont de formes allongées, formes typiques de la luzerne (Corby, 1981 ; Duhoux et Nicole, 2004). La plupart des nodules des plants examinés ont présenté une couleur blanchâtre, quelques nodules avaient une couleur rose révélatrice de la présence de leghémoglobine, composé indispensable à la fixation d'azote (Blandeau, 1981). La taille des nodules des plantes traitées, montre que la majorité est de petite taille, se développent en grappes.

Selon Dommergue et al ; (1999), le nombre des nodules est l'une des méthodes qui permet l'évaluation de l'activité fixatrice d'azote.

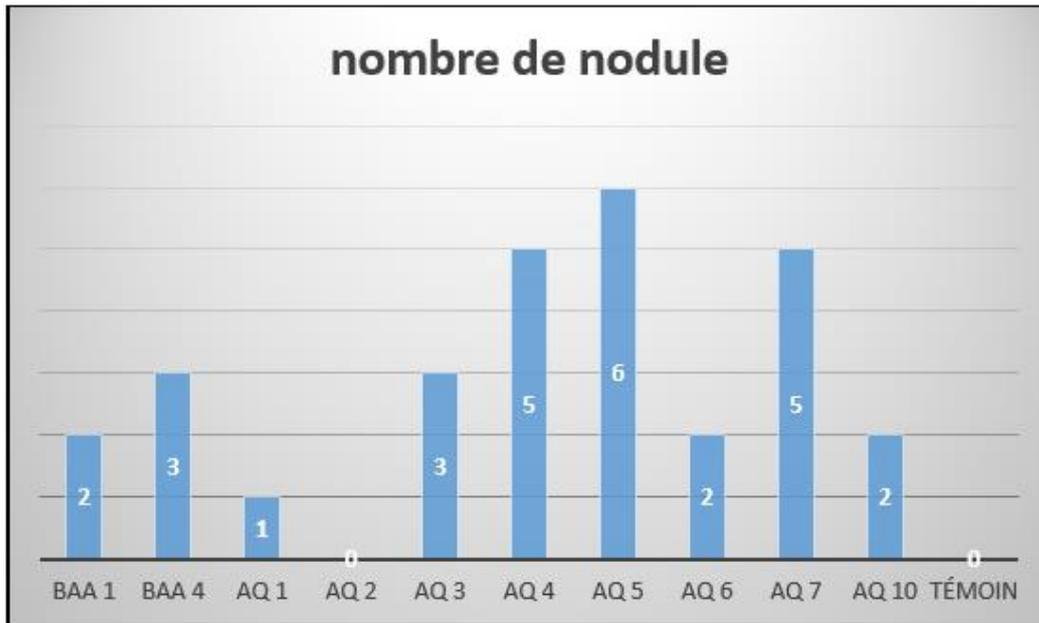


Figure 16 : L'effet des souches bactériennes sur le nombre des nodules.

Le graphe ci-dessus, montre que sur les plantes de *Pisum sativum* testées les souches AQ1, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10, BAA1, BAA4 favorisé la nodulation par rapport la souche AQ2 et le témoin non inoculé (aucun nodule).

Les souches les plus performantes :AQ4, AQ5, AQ7 ont conduit à la formation, respectivement, de :5,6,5 nodules / plante.

Suivies par les souches, BAA4, AQ3, BAA1, AQ6, AQ10 à moindre nombre avec 2 à 3. La souche AQ1 est celle qui a présenté le nombre faible de nodule (1 nodule).

Nous avons observé des nodules sur les racines principales et secondaires. Ils sont répartis majoritairement au niveau des racines principales ; les plantes de *Pisum sativum* inoculées par les souches AQ4, AQ7. Présents des nodules uniquement sur les racines principales, Concernant les autres souches, nous avons observé des nodules sure les racines principales et les racines secondaire.

III.1.2.2. Evaluation des parties aériennes et racinaires

A partir des résultats de la figure ci-dessus, nous avons remarqué que les plantes inoculées par les souches BAA1, BAA4, AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5, AQ6, AQ7, AQ10 ont eu une bonne croissance la partie aérienne en comparaison aux la plante témoin, avec une longueur moyenne égale à :13,35 ;13,99 ;14,46 ;15,45 ;15,28 ;13,21 ;14,21 ;14,94 ;14,84 ;13,98. D'après Glick

(1995) a démontré que la synthèse des auxines par les rhizobactéries est impliquée dans l'élongation racinaire.

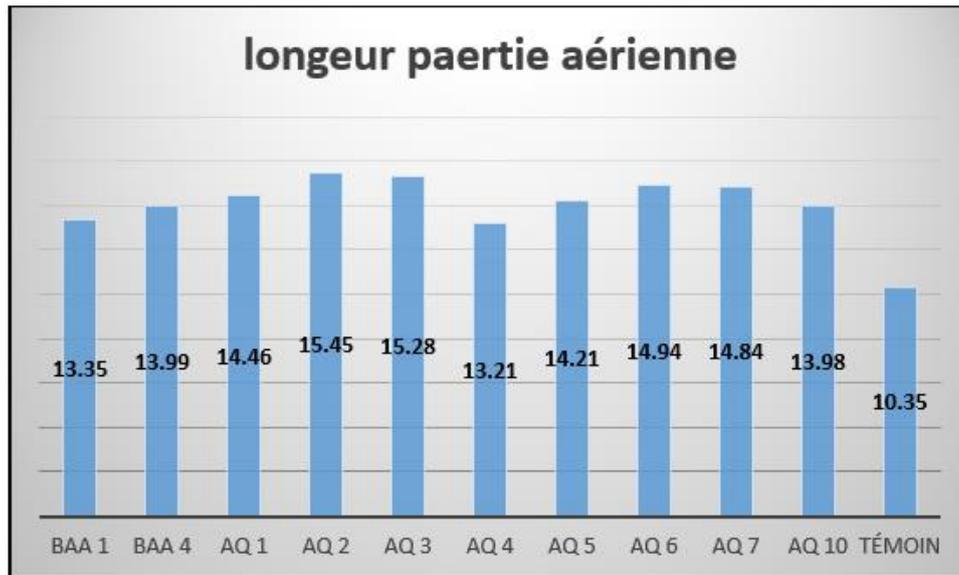


Figure 17 : La longueur des parties aériennes de *Pisum sativum*

a) Poids frais de la partie racinaire

Le poids frais de la partie racinaire le plus élevée a été obtenu chez les plantes nodules par les souche BAA4 ; AQ5 ; AQ7 avec 0,79 ;0,82 à 0,86 g, en comparaison aux autres plantes inoculé par les souches AQ1 ; AQ2 ; AQ3 ont enregistrées les poids frais faible. Concernant la plante témoin ont eu un poids frais plus faible avec 0,18g.

D'prés MEZNI et SIFI, (1998), le rendement en matière sèche c'est un critère principal dans l'évolution de l'activité fixatrice d'azote atmosphérique dont il est influencé significativement par l'effet de l'inoculation et le type de la souche.

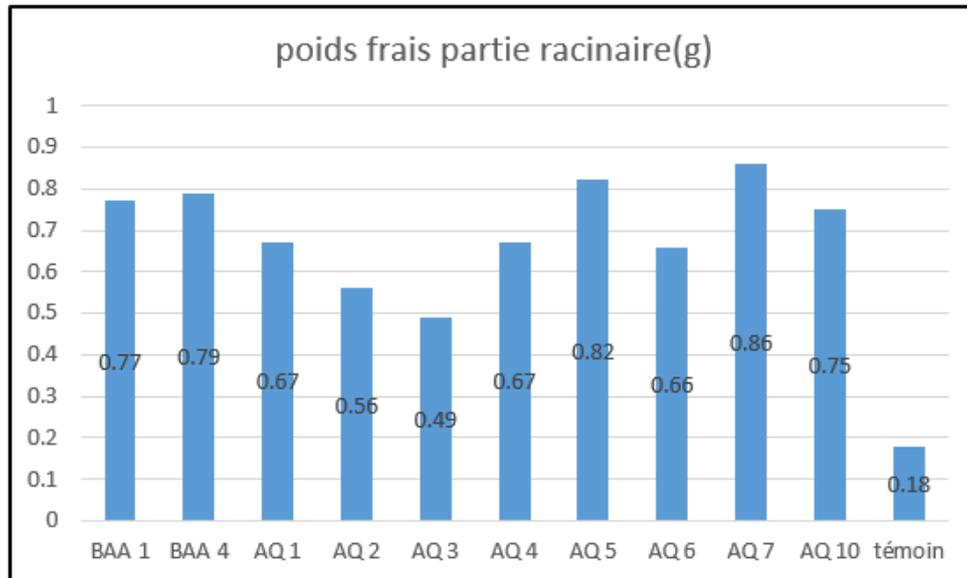


Figure 18 : Poids frais de la partie racinaire de *Pisum sativum*

b) Poids frais de la partie aérienne

L'efficacité de chaque souche est estimée par la détermination du pourcentage en matière fraîche des plantes inoculées par rapport au témoin.

D'après la figure 28, les souches isolées ont induit une augmentation significative du poids frais de la partie aérienne de *Pisum sativum*. L'effet de l'inoculation sur la croissance des plants varie d'une manière non significative entre les différentes souches bactériennes.

La meilleure biomasse fraîche est notée chez les plants de *Pisum sativum* inoculés avec la souche AQ10, soit une augmentation de 380 % par rapport au témoin non inoculé.

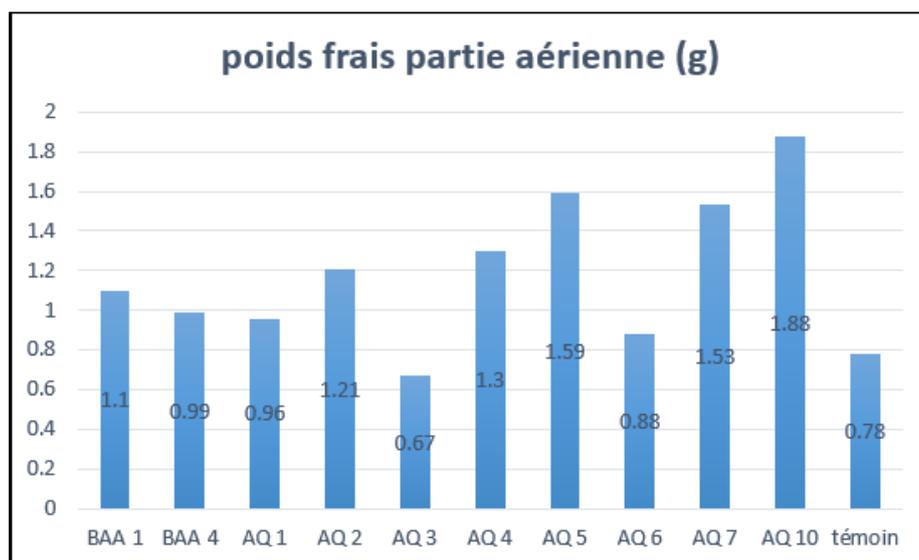
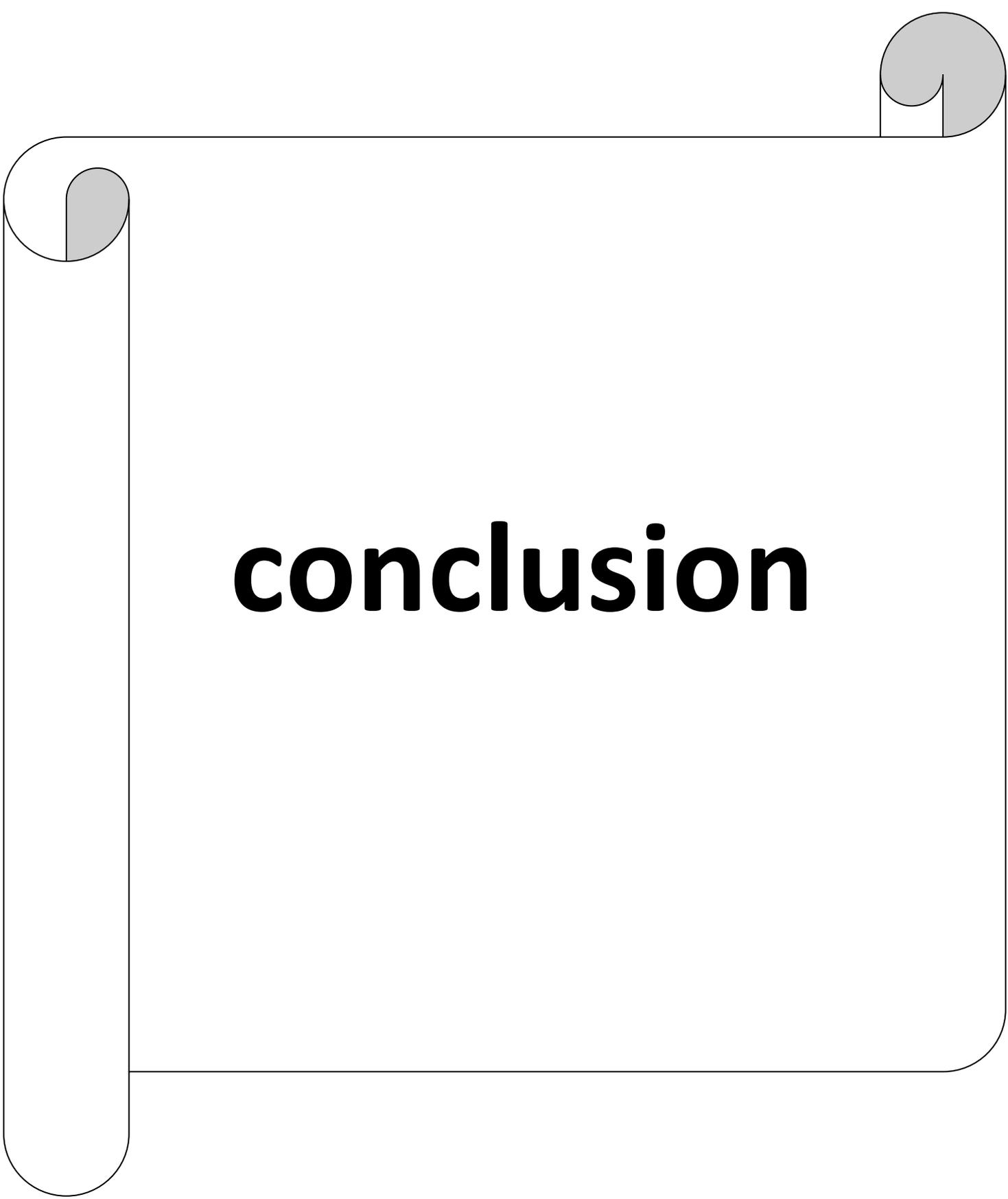


Figure 19 : Poids frais de la partie aérienne de *Pisum sativum*



conclusion

Conclusion

La rédaction de ce rapport nous a appris à synthétiser plusieurs travaux de recherche en approfondissant nos connaissances. L'usage d'inoculants rhizobiens dans les cultures est assez récent et encore peu employé pour les agriculteurs. Inspirés par le succès qui ont réalisés dans les pays développés.

Les biofertilisants à base de *rhizobium* autochtones est un projet qui peut participer dans l'amélioration de la fertilité des sols cultivés et d'assurer la durabilité de la production agricole Algérienne.

Les différents travaux réalisés dans ce mémoire ont permis d'atteindre l'objectif fixé au départ. Il a montré une diversité physiologique et symbiotique des souches rhizobiennes isolées du *Pisum Sativum* dans la région de Hassasna à Saida.

A partir de cette région et de cette plante, le présent travail nous a permis d'isoler 10 souches de *Rhizobium*, contribuant ainsi à l'enrichissement de la collection du laboratoire. Le test d'authentification a confirmé l'aptitude de ces souches à noduler la plante hôte.

On s'accorde à dire d'une manière générale que Cette étude permettra de constater l'intérêt de la symbiose rhizobienne des cultures et qui permis à favoriser une agriculture à la fois plus productive et plus durable.

Les perspectives envisagées pour compléter cette étude sont les suivantes :

- ✓ Constitution d'une collection de souches provenant de diverses plantes.
- ✓ Le transfert des expérimentations aux champs en matière de production d'inoculum à base de souches performantes ; test de leur efficacité à échelle pilote, en pépinière et dans des parcelles d'expérimentation.
- ✓ Installation des unités de production de biofertilisants à base de microorganismes



Les références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Site web 1 : <https://www.aquaportail.com/definition-1111-rhizobium.html>

Site web 2 : Rhizobium : définition et explications (aquaportail.com)

Site web 3 : Rhizobium: Que sont-ils, leur relation avec les légumineuses et leurs bienfaits | Jardinage sur (jardineriaon.com).

Site web 4 : (<https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinaires.html>)

Site web 5 : (http://www.fao.org/ag/agl/agll/ipns/index_fr.jsp?term=b175&letter=B).

Site web 6 : (http://svt.ac-dijon.fr/IMG/pdf/ppt_interactions_plantes-mo.pdf).

Site web

7:(<https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=zvHhPoia&id=66C6D2FB4>).

Site web 8 : Pois mangetout — Wikipédia (wikipedia.org)

Ali M.E., Khanam D., Bhuiyan M.A.H., Khatun M.R. and Talukder M.R., 2008. Effect of Rhizobium Inoculation to Different Varieties of Gardenpea (*Pisum sativum* L.). Bangladesh Agricultural Research Institute (BARI), Joydebpur, Gazipur, Bangladesh, 2008, J. Soil. Nature. 2(1): 30-33.

Alkama N., Nouredine N.E., Haddadj A., Sadjji H., Issad S., Amrani S., (2002). La pratique de l'inoculation en agriculture et en foresterie : une biotechnologie à notre portée communication orale présentée au 2eme congrès de Biotechnologie. Tunisie.

Anonyme. <http://www.cours-en-ligne.tk/>

Baba Arbi S. (2016). Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse de Doctorat, Microbiologie Appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba, p. 13, 33.

Bargaz., (2012). Low Soil Phosphorus Availability Increases Acid Phosphatases Activities and Affects P Partitioning in Nodules, Seeds and Rhizosphere of [i]Phaseolus vulgaris[/i].

Barrada, H. and Fikri-Benbrahim, K. (2014) Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal 4, 616-639.

Benselama A. 2015. Réhabilitation de la culture du Lablab purpureus et études de partenaire symbiotique. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1, p.25.

Bergersen F.J. (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Edition John Wiley et sons.

- Chaich K. (2018).** Diversité des associations Rhizobium-Légumineuses de quelques espèces spontanées du Sahara septentrional. Thèse de Doctorat, Sciences Agronomiques. Université Kasdi Merbah Ouargla, pp. 14-17, 70.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., Bono, J. J. (2001).** Perception of lipo chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* 6, 24-30.
- Dakora, F. D. (1985)** Nodulation and nitrogen fixation by groundnut in amended and unamended field soil in Ghana. In: *Biological fixation in Africa*. Ssali, H. and S.O. Keya(eds). 324- 339. Proceedings of the first conference of the African association for biological nitrogen fixation (AABNF) held in Nairobi, Kenya, 23 to 27 July 1984.
- Dart, 1975 ; Newcomb et al ; 1979 ; Newcomb et Tandom, 1981** Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du *Sulla* du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficientes.
- Date R.A. 2000.** Inoculated legumes in cropping systems of tropics. *Field Crops Res.* 65 : 123-136.
- Davet P., (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. Quae. Paris. 383p.
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC. (1996).** Rhizobium lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry.* 65 : 503–535.
- Duhoux, E et Nicole, M. (2004).** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France. P1 - 20.
- FAO, (1989)** In Organisation Des Nations Unis Pour L'Alimentation Et L'Agriculture. Fichier Technique De La Fixation Symbiotique De L'Azote, Légumineuse /Rhizobium 1992.Rome, Italie.
- FAO., (1992)** Fichier Technique De La Fixation Symbiotique De L'Azote, Légumineuse/Rhizobium.FAO, Organisation Des Nations Unis Pour L'Alimentation Et L'Agriculture., Rome, Italie
- Gibson, KE., Kobayashi, H., Walker, GC. (2008).** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* 42 : 413–441.
- Giles E.D., Oldroyd., Dawnin J.A., (2004).** Calcium, Kinases and nodulation signalling in legume. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, pp 566-576.
- Graham P.H., (2008).** Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth M.J, James E.K., Sprent J., L., Newton W.E.(Eds): *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer, p23-43.

- Hejjaoui., (2013)** Caractérisation génétique des populations locales de *Vicia faba* L. par la technique des SSR.
- Hirsh P.R., (1996):** Population dynamics of indigenous and genetically modified Rhizobia in the field. *New Phytol.*, 133: 159-171.
- Ibekwe A.M., Angle J.S., Chaney R.L., van Berkum P, (1995).** Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. *J. Environ. Qual.* 24, 1199–1204. *J Bacteriol.* 187: pp 405-414.
- Jordan, D.C. (1984).** Family Rhizobiaceae, In Kreig N.R.and Holt J.H.(Ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol,1 the Williams and Wlikins Co, Baltimore, p234- 256.
- KRIMI, S. FELOUAT, R. BOUHLAIES, A. (2021).** Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Symbiose Rhizobium-légumineuse et diversité des rhizobia nodulant les légumineuses de la tribu des Viciae.,p 12.
- Long et Staskawicz, (1993).** *Cell* 73,921-935.
- Long, S. R. (1996).** Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8, 1885- 1898.
- Longfei Zhao et al, (2010).** Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China.
- Messiaen C.M et Messiaen-Parotto F. (2006).** Les légumineuses. In *Le potager familial méditerranéen : Guide pratique*. Quae.pp 100-111. ISBN : 1952-2770.
- Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J. (2001).** Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit- Rev- Plant- Sci* 20, 373-394.
- Obaton, M., (1989)** Généralités sur l'inoculum in *Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote légumineuse/ Rhizobium* FAO, Rome.
- Pawlowski k, Bisseling T. (1996).** Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features, *Plant Cell* 8, 1899-1913.
- Rasanen L.A., (2002).** - Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.
- Rasebery ;(1997).** Caractérisation d'actinomycètes antagonistes au *Phytophthora fragariae* var. *rubi* causant un pourridié des racines chez le framboisier.
- Razafindrazaka., (2015).** Amélioration du taux de survie des larves de *penaeus monodon* pendant l'élevage larvaire par utilisation à taux progressif d'*Artemia salina* ;

cas de la société OSO FARMING LGA ANKARANA.

Schneider A., 2015 : Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaire durables ; édition Quae, France.

Selami N .2017. Destine aux étudiant de deuxième année master en biotechnologie et génomique végétal, Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, polycopie de cours, université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, page 25.

Selami N. (2017). Associations Symbiotiques. Polycopie Du Cours, Biotechnologies. Université d'Oran Mohamed Boudiaf, pp. 11, 14, 20.

Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the Pisum genus. Plant Genetic Resources. 9 : 4 –18

Somasegaran, P et Hoben, H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag. Berlin.

Somasegaran, P; Hoben H, G.1994. Handbook for Rhizobia, Sringer verlage, New York.

Sprent J.I., (2001). Nodulation in legumes. Dickerson (Eds). Royal botanical garden. Kew. United Kingdom. 364p.

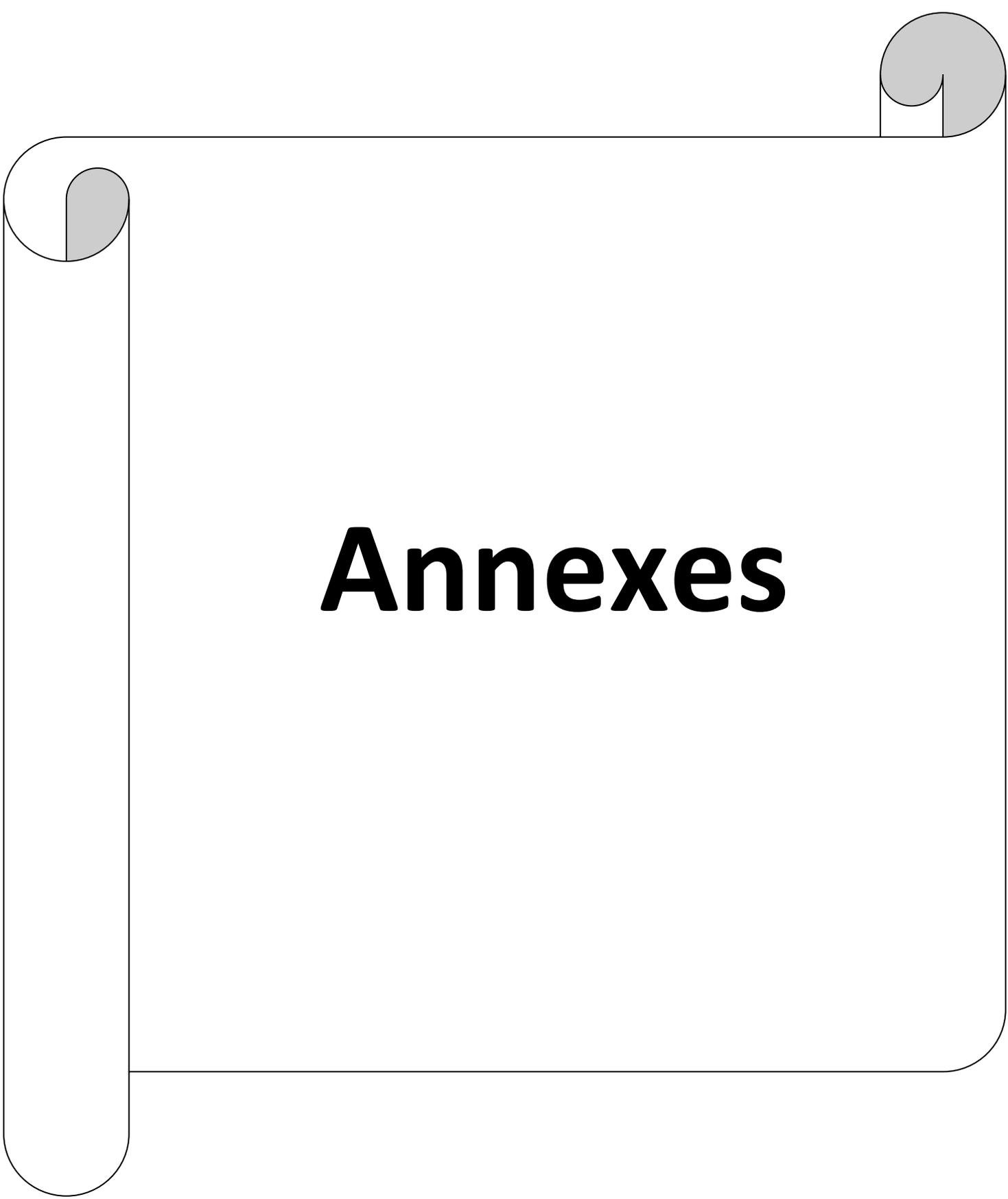
Srarfi F., Kharrat M., Nasraoui B., Zouani R., Achari H., Amraoui S., Ben Abdallah M.A., 2008. La culture de petit pois. Document technique en arabe. AVFA.

Tombozara N, (2014). Relation entre la disponibilité de l'azote (n) et du phosphore (p) des sols, la mineralomasse (n et p) de la plante et la nodulation du haricot : cas d'essai multilocal dans les parcelles paysannes du moyen ouest de madagascar, Athenee Saint Joseph Antsirabe, 2014,104p.

Tourene M. (2018). Identification de bactéries associées au genre Genista. Mémoire de Master, Ecologie Microbienne. Université A. MIRA – Bejaia, pp. 9-11.

Vincent JM .1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

Werner D., 1992: Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.

A decorative border resembling a scroll or ribbon, with rounded corners and a grey shaded area on the left side.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Matériel Utilisé pour l'étude.

Matériel de Laboratoire :

Le matériel utilisé dans cette étude est répertorié dans le tableau suivant :

Désignation
Éprouvette graduée 1L, Erlen Meyer 1L, bêcher 250ml , Eppendorf, Agitateur magnétique chauffant, barreau magnétique, Agitateur vortex, Ph mètre, balance de précision, balance analytiques, boîtes pétri, Tubes à vis en verre, micropipette, pipette Pasteur, autoclave, étuve, hotte à flux laminaire, microscope optique, bec Bunsen.

Réactifs chimiques :

- ❖ Le chlorure de Calcium (CaCl_2),
- ❖ L'éthanol 95%,
- ❖ L'eau de Javel 3%,
- ❖ Bouillon YMB,
- ❖ Gélose YMA,
- ❖ Glycérol 60%,
- ❖ L'eau distillée stérile.

Annexe 2 : Milieux de culture :

❖ **Milieu YMB (Yeast-Mannitol-Broth) en g/l (Vincent, 1970) ;**

Milieu de culture pour rhizobium :

Produit	Quantité pour un litre de milieu	Photo Originale
Mannitol	15 g/l	
Extrait de levure	01g/l	
K2HPO4	01g/l	
MgSO4. 7H2O	01g/l	
NaCl	01g/l	
L'eau distillée	01 l	

Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20 min.

❖ **Milieu YMA (Yeast-Mannitol-Agar) en g/l (Vincent, 1970):**

Produit	Quantité pour un litre de milieu	Photo Originale
Mannitol	10.0 g/l	
Extrait de levure	0.5g/l	
K2HPO4	0.5g/l	
MgSO4. 7H2O	0.2g/l	
NaCl	0.1g/l	
L'eau distillée	01 l	

Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20 min.

Préparation de milieu de culture :

Suspendre 10.0g de Mannitol dans un 1L d'eau distillé, ensuite rajouter le reste des produits sauf l'agar et chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu, verser dans les flacons en verre l'agar puis ajouter le bouillon préparé puis stériliser par l'autoclave à 120°C pendant 20min.

❖ **Eau gélosé 1% :**

Agar-agar.....1g

Eau distillée.....100ml

PH 6.8 à 7. Stériliser pendant 20 min à 120°C.

Annexe 3 : Protocole de la coloration de Gram

Préparation d'un frotti:	
-Des colonies pures isolées à partir des cultures sur YMA et suspendues dans une goutte d'eau distillée et étalées à l'aide d'une anse en couche mince sur une lame et laisser sécher à l'aire libre jusqu'à ce que le frotti présente un aspect mat. - Fixer par chaleur le frotti, par passée 3 fois la lame dans la flamme du bec benzène (pour tuer les bactéries et les coller sur la lame).	
La coloration VLAFF:	
1	Réaliser une coloration primaire avec Violet de Gentiane. Recouvrir la lame par le colorant et laisser agir pendant 1 minute
2	Fixer la couleur de Violet de Gentiane par verser sur la lame solution iodée (le Lugol) et laisser agir pour 30 secondes (fixation de mordant).
3	Rincer la préparation avec l'eau distillée pour éliminer les traces de premier colorant.
4	Décolorer avec l'alcool par incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'éthanol 95% pour 5 secondes
5	Rincer de nouveau abondamment à l'eau distillée pour éliminer l'alcool.
6	Appliquer une contre coloration par Fuchsine et laisser agir 1 minute.

7	Laver encore une fois la préparation.
8	Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen la préparation pour l'observer ensuite par microscope optique.

Annexe 4 :**❖ Solution nutritive des plantes (Bertrand, 1997)**

CaCl₂(294 .04g/l) 1ml

MgSO₄ .7H₂O(246.48g/l) 1ml

KH₂PO₄(13.609g/l) 1ml

Kcl(223.65g/l) 1ml

La solution de micro-éléments :

H₃BO₄ (6.25g/l)40µl

MnSO₄.4H₂O (6.25g/l) 40µl

ZnSO₄.7H₂O(6,25g/l) 40µl

CuSO₄.5H₂O(6.25g/l)40µl

Na₂MoO₄.2H₂O(0.625g/l)40µl

CaCo₃ (1g/l)40µl

Sequestréne de fer (solution à16.6g/l)1ml

Ca(NO₃)₂(82g/l)1ml

L'eau distillée 1000ml

Agiter ces constituants jusqu'à l'obtention d'une solution homogénéisée

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 5 :

Tableau de turbidité de mcfarland :

Standard McFarland	0,5	1	2	3	4
Chlorure de baryum à 1% (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Acide sulfurique à 1% (ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
Densité cellulaire approximative (1 × 10.8 UFCs/mL)	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0
% transmittance *	74,3	55,6	35,6	26,4	21,5
Absorbance *	0,08 à 0,1	0,257	0,451	0,582	0,669