

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie
Spécialité d'Ecologie Microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries symbiotiques
nodulantes
des légumineuses fourragères**

Présenté par :

M^{elle} CHITOUR Sanda & M^{elle} MAZ Sonia

Soutenu le : **23/09/2021**

Devant le jury composé de :

M^r BENSALD Karim

M^{elle} SALMI Adouda

M^{me} BENSIDHOUM Leila

MAA

MCB

MCB

Président

Encadreur

Examineur

Année universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENT

À l'issue de notre formation, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant.

Nos remerciements les plus vifs et notre profonde reconnaissance s'adressent à notre promotrice, Mme Salmi Adouda, pour sa qualité humaine, sa patience, on la remercie de nous avoir guidés, conseillée, pour mener à bien ce travail.

Nos remerciements et notre reconnaissance s'adressent à Mr Bensaid pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et à Mme Bensidhoum pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nous tenons également à remercier Mm Boulila qui nous a accueillis dans le Laboratoire d'Écologie Microbienne.

Tout comme nous exprimons les mêmes sentiments de gratitude à tous les enseignants qui nous ont comptés parmi leurs étudiants tout au long de notre formation.

Enfin nous finirons par remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SANDA et SONIA

DÉDICACES

À ma mère

Pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices

À mon père

Pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordée

Aucun mot ne serait suffisant pour les remercier. Qu'Allah les protège et les garde.

À mes frères et sœurs

Billal, Aimade, Hamou, Sohila, Nassia, kahina, Nassia, Berkaoume, yassmina et Taous, je vous dédie ce modeste travail en témoignage de l'amour que je ressens pour vous. Vous ne cessez de veiller sur moi. Merci pour tous.

À mon fiancé Lyess, qui a toujours été à mes côtés surtout dans les moments les plus difficiles.

À ma binôme Sonia pour son entente et sa sympathie.

À mes camarades Smail, Nassima et Dida, pour leurs indéfectibles soutiens et leurs patiences infinies

À toutes les personnes qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévance, de courage et de générosité.

SANDA

DÉDICACES

À ma mère

Pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices

À mon père

Pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordée

Aucun mot ne serait suffisant pour les remercier. Qu'Allah les protège et les garde.

À mes frères et sœurs

Farej Allah, Boukhalfa, Faycel, Nadia, Shakira, Ghania, Louiza, Djamila, je vous dédie ce modeste travail en témoignage de l'amour que je ressens pour vous. Vous ne cessez de veiller sur moi. Merci pour tous.

À ma binôme Sanda pour son entente et sa sympathie.

À mes camarades Lylia, Thiziri, Mannone, Chahinez, Ounissa, pour leurs indéfectibles soutiens et leurs patiences infinies

À toutes les personnes qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévance, de courage et de générosité.

SONIA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	01
--------------------	----

Synthèse bibliographique

I .Fixation biologique de l'azote	03
I .1. Généralités sur l'azote	03
I .2. Microorganismes fixateurs d'azote.....	04
II. Symbiose rhizobia-légumineuse	04
II .1.Partenaire Végétal: Légumineuse	05
II.1.1.Généralités	05
II.1.2. Genre <i>Trifolium</i>	05
II.1.3. Intérêt du genre <i>Trifolium</i>	08
II.2. Partenaire microbien : Rhizobia.....	09
II.2.1.Généralités	09
III. Interaction légumineuse-rhizobia.....	09
III.1. Dialogue moléculaire rhizobia-légumineuse.....	10
III.2. Nodulation	10

III.3. Fixation enzymatique de l'azote : la nitrogénase	12
IV. Méthodes d'études des rhizobia	15
IV.1. Méthodes phénotypiques	15
IV.2. Méthode numérique.....	15
IV.3. Méthode moléculaire.....	15

Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	17
I.1. Analyse du pH et de l'humidité des sols	18
II. Isolement et constitutions d'une collection bactérienne	19
II.1. Désinfection des nodules	19
II.2. Efficacité de la désinfection des nodules	19
II.3. Ensemencement et purification des isolats.....	19
II.4. Conservation des isolats	19
II.5. Test distinctif enter <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> (Test du 3-Cétolactose) ...	20
II.6. Authentification des isolats.....	20
II.6.1. Désinfection des graines	20
II.6.2. Germination des graines	20
II.6.3. Préparation des cultures bactériennes et inoculation des plantules ...	21
III. Caractérisation phénotypique des isolats	21
III.1. Caractérisation morphologique des colonies.....	21
III.2. Caractérisation cellulaire des isolats	21

III.3. Caractérisation physiologiques des isolats	21
III.4. Caractérisation biochimique	21

Résultats et discussion

I. Aspect des nodules prélevés.....	26
II. Détermination du pH et de l'humidité des sols	26
III. Constitution d'une collection d'isolats.....	27
III.1. Résultats de l'isolement.....	27
III.2. Distinction entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> (Test du 3-Cétolactose) ..	27
III.3. Authentification des isolats.....	28
IV. Caractérisation phénotypique des isolats	28
IV.1. Caractérisation morphologique et cellulaire.....	28
IV.1.1. Caractérisation morphologique	28
IV .1.2. Caractérisation cellulaire	29
IV.2. Caractérisation physiologique des isolats.....	30
IV.3. Caractérisation biochimique	34
Conclusion et perspectives	36

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

BNL : Bactéries Nodulant les légumineuses

DO : Densité optique

EPS : Exopolysaccharide

IPA : Indice de Pollution Atmosphérique

KCL : Chlorure de potassium

Log : Logarithme

NR : Nitrate Réductase

ONPG : Ortho nitrophenyl β -D-galactopyranoside

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel en Hydrogene

RM : Rouge de Méthyle

TSI: Triple SugarIron Agar

VP:Voges-Proskauer

YMA: Yeast Manitol Agar

YMB: Yeast Manitol Broth

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique simplifiée du cycle de l'azote	03
Figure 2 : Photo d'une plante de trèfle blanc	06
Figure 3 : Morphologie de <i>Trifolium repens</i> (Fleurs, graines et système racinaire)	07
Figure 4 : Morphologie de <i>Trifolium campestre</i> (Fleurs, graines, système racinaire)	07
Figure 5 : Processus de la nodulation	12
Figure 6 : Structure de la nitrogénase (Dixon et al., 2004)	13
Figure 7 : Représentation schématique du fonctionnement du complexe nitrogenasique	14
Figure 8 : Photos de deux plantes de <i>Trifolium</i>	17
Figure 9 : Aspect morphologique des nodules racinaires de <i>T.repense</i> , <i>T.campastre</i>	26
Figure 10 : Résultats de test de stérilité des nodules	27
Figure 11 : Résultats du test distinctif entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	28
Figure12 :Aspect des colonies formées par les isolats de <i>T.repens</i> , <i>T.campastre</i> sur YMA	29
Figure13 : Exemple d'une observation microscopique de frottis de souches sous microscope optique (G X100)	29
Figure 14 : Résultats de l'effet de la température sur la croissance des souches étudiées	30
Figure 15 : Résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiées.....	31
Figure 16 : Résultats de l'effet du NaCl sur la croissance les souches étudiées	32

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>Trifolium campestre</i> et <i>Trifolium repens</i>	08
Tableau II : Valeurs des pH et l'humidité des sols échantillonnés dans la région de Bejaïa	26
Tableau III : Résultats des tests biochimiques des bactéries isolées de <i>T.repens</i> , <i>T.campestre</i> et la souche	34

Introduction

Les fourrages naturels herbacés Algériens sont une bonne source d'énergie et de protéine, les apports de certaines espèces sont au même niveau, voire meilleur que certaines ressources fourragères cultivées (Zirmi-Zembri et Kadi, 2016). La flore Algérienne fourragère renferme environ 293 espèces (Quezel et Santa, 1962). Le genre *Trifolium* (trèfle) comporte à lui seul 37 espèces, il est considéré parmi les genres les plus riches au sein des légumineuses fourragères (Issolah et Beloued, 2005). Les espèces formant ce genre sont intégrées dans les systèmes de culture pour économiser les intrants et limiter l'extension de la jachère ou comme tête d'assolement dans une succession culturale (Mebarkia et Abdelguerfi, 2006).

Il est connu que le trèfle se caractérise par sa capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique spécifique avec des rhizobia, pour répondre à ses propres besoins azotés et assurer le bon fonctionnement de son métabolisme (Louarn et al., 2016). Cette spécificité confère à cette association un rôle clé dans les flux azotés des systèmes de production végétale (Voisin et Gastal, 2015). Elle permet aussi de réduire les facteurs de stress du sol, tels que l'acidité et la salinité (Lawson et al, 1995).

En tenant compte de l'importance des légumineuses et des associations symbiotiques, celle du trèfle en particulier, plusieurs études ont été menées en Algérie (Ibekwe et col, 1995), ayant pour objectif principal l'évaluation de ces légumineuses fourragères pour la mise en relief de leur intérêt socio-économique et environnemental (lutte contre l'érosion des sols en pente). La valorisation de ces espèces permettra en effet d'assurer une alimentation du bétail suffisante, diversifiée et équilibrée, basée sur des ressources fourragères spontanées et/ou locales. Par voie de conséquence, une réduction de la facture à l'importation des fourrages, un développement de l'élevage, de la production laitière, des viandes et de l'apiculture et enfin une création d'emplois à travers le pays, particulièrement dans les régions les plus déshéritées, ou l'apport d'engrais ne sont pas intéressants sur le plan économique (Issolah, 2008).

Les travaux réalisés constituent donc une contribution à l'élaboration d'une stratégie de développement des fourrages en Algérie, une attention est donnée à son partenaire microbien, un associé indispensable et clé dans ce genre de culture (Issolah, 2008). C'est dans cette optique que s'inscrit cette étude qui a pour but principal l'isolement ainsi que la caractérisation phénotypique et symbiotique, des bactéries associées aux deux espèces de

légumineuses *Trifolium campestre* et *Trifolium repens*, collectées au niveau de deux sites de la région de Bejaïa.

Ce mémoire comprend trois chapitres essentiels : le premier aborde une synthèse bibliographique donnant un aperçu général sur les deux partenaires symbiotiques (légumineuse et rhizobia) mais surtout leurs interactions (symbiose légumineuse-rhizobia). Le second chapitre correspond à la méthodologie de travail adoptée et enfin le dernier est consacré à la présentation des résultats obtenus et leurs discussions.

*Synthèse
bibliographique*

I. Fixation biologique de l'azote

I.1. Généralités

Élément majoritaire, l'azote atmosphérique représente 80 % de l'air. Il est considéré comme la principale source d'azote de la planète, et constitue après l'eau, l'un des facteurs limitants de la production végétale (Péret, 2007). Bien que les sols contiennent des réserves importantes en cet élément, mais ce dernier n'est pas directement assimilable par les plantes (Jensen and al., 2002). En revanche, il est disponible pour certaines espèces de microorganismes dites « diazotrophes » par fixation biologique (Rees et Howard, 2000).

L'azote se transforme sans cesse d'une forme minérale à une forme organique formant un cycle (Figure 1). Il passe successivement par les étapes de fixation, de nitrification et de dénitrification. Puis il est de nouveau soumis à une nitrification. La matière organique contenant l'azote se décompose dans le sol sous l'action des microorganismes. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (Saoudi, 2008).

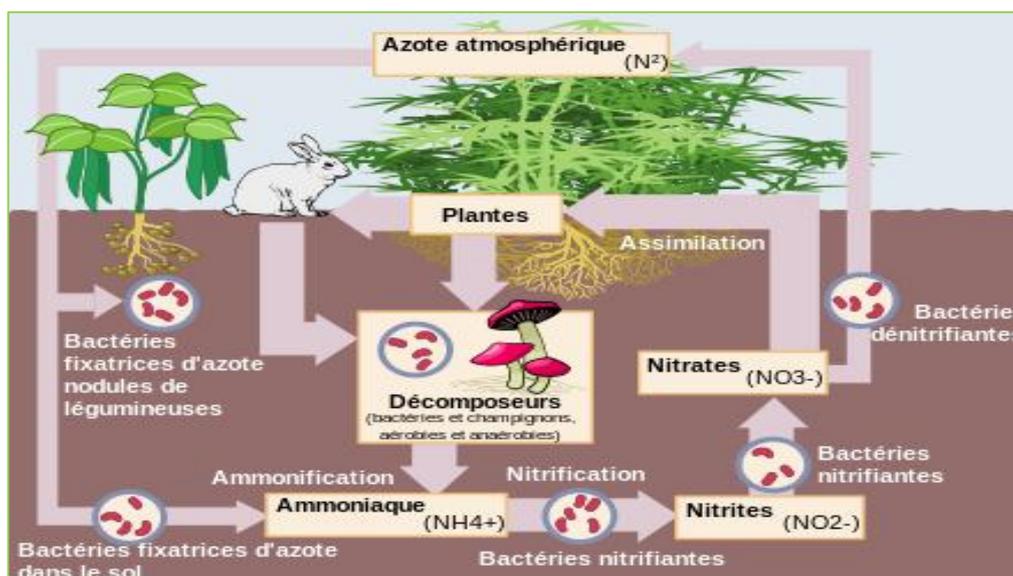


Figure 1 : Représentation schématique simplifiée du cycle de l'azote (Pujic et Normand, 2009)

La fixation biologique de l'azote atmosphérique incorpore chaque année environ 200 millions de tonnes d'azote. À titre de comparaison, la moitié de cette quantité est fixée industriellement (Arp, 2000).

Les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30°C – 35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères : pression de 250 atm à 1000 atm de N₂ et température de 450°C (Peret ,2007).

I.2. Microorganismes fixateurs d'azote

La fixation biologique de l'azote est une partie importante des processus microbiens (Simon, 2003). Elle est effectuée uniquement par des diazotrophes capables de convertir l'azote atmosphérique en ammoniac grâce à une enzyme appelée « nitrogénase » (Madigan et al., 2007). Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à des groupes taxonomiques très divers regroupant beaucoup d'espèces bactériennes.

Selon leur état, on peut les classer en deux groupes :

1-Fixateurs libres

Les fixateurs libres d'azote atmosphérique, notamment les bactéries, sont très répandues. Ils colonisent les sédiments marins ainsi que ceux des eaux douces, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003). Ils comprennent des genres très divers : bactéries chimioorganotrophes (*Azotobacter*, *Azospirillum*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*), des anaérobies facultatifs (*Klebsiella*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*), (Elmerich et al., 1993).

2-Fixateurs symbiotiques

C'est le cas des systèmes symbiotiques associant des plantes de la famille des légumineuses ou les non-légumineuses (*Parasponia*, famille des *Cannabaceae*) et les rhizobia (Moulin, 2001). D'autres actinomycètes du genre *Frankia* (Bactéries Gram positif, filamenteuses et sporulâtes) nodulent des plantes ligneuses appartenant à différentes familles des dicotylédones tels que les aulnes (Benson et Silvester, 1993) ou également les associations avec les cyanobactéries (Roger et al., 1996).

II- Symbiose rhizobia- légumineuse

La symbiose fixatrice d'azote la plus répandue est celle qui associe les rhizobia et les plantes de la famille des légumineuses (Allen et Allen, 1981). Elle a été décrite pour la première fois par Frank (1889), et présente un intérêt agronomique considérable. En effet,

l'azote minéral est une ressource principale azotée des plantes est dans le cas des plantes cultivées, fournies par des engrais chimiques posent des problèmes de pollution, en particulier des nappes phréatiques par le lessivage. Alors que l'azote fixé par la symbiose est restitué au sol après la décomposition de la matière végétale (racines, nodules, parties aériennes), ou via les déjections des animaux ayant pâture (Ndiaye, 1996).

Dans l'association légumineuse-rhizobia, les plantes utilisent les produits de la fixation bactérienne de l'azote. En contrepartie, la plante hôte fournit aux bactéroïdes des composés carbonés et de l'énergie (Richter, 1993).

II.1. Partenaire végétale : Légumineuse

II.1.1. Généralités

Les légumineuses constituent la troisième plus grande famille botanique avec environ 750 genres et plus de 19000 espèces (Prin et al., 2017), allant des plus petites herbacées aux grands arbres des forêts tropicales. Elles sont reconnues comme une excellente source de protéines, de minéraux (fer, cuivre, zinc...) et de vitamines (vitamine B9) mais aussi de fibres alimentaires, ce qui fait qu'elles sont largement utilisées pour l'alimentation animale et humaine (Lafond et Pageau, 2007).

La famille des légumineuses se caractérise par sa capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique spécifique avec des microorganismes telluriques (rhizobia), pour répondre à leurs propres besoins azotés et assurer le bon fonctionnement de son métabolisme (Louarn et al., 2016). Cette spécificité confère aux cultures de légumineuses plus de disponibilité en azote minéral assimilable, mais aussi joue un rôle clé dans les flux des systèmes de production végétale (Voisin et Gastal, 2015). Son fruit appelé gousse ou légumes est à l'origine du nom des légumineuses sous lequel cette famille est plus connue (Ozenda, 1991).

II.1.2. Genre *Trifolium*

Les trèfles sont des plantes herbacées de la famille des Fabacées (Légumineuses), elles forment le genre *Trifolium*. Ils sont caractérisés par leurs feuilles composées à trois folioles et leur capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à des bactéries symbiotiques

hébergées dans leurs racines (Ellison et al. 2006). Ils en existent beaucoup d'espèces et parmi eux nous avons choisi deux espèces très répandues pour les étudier.

II.1.2.1. *Trifolium repens*

Trifolium repens ou trèfle blanc (Figure 2 et 3) (Gaston et al., 1990), est originaire des régions tempérées de l'Ancien Monde. C'est l'une des espèces les plus répandues du genre *Trifolium*. Utilisée comme fourrage, c'est également un adventice des terres cultivées (notamment les vergers irrigués) et des jardins. Très commune, elle s'adapte à tous les types de sols, et prospère dans les prés, les pelouses, les talus, sur le bord des routes ou des chemins (Voisey et al., 1994). C'est une plante bio indicatrice d'un sol riche en bases et en matières organiques et subissant de forts contrastes hydriques (Ducarf et Thiry, 2003).



Figure 2 : Photo d'une plante de *Trèfle blanc*

- **Description botanique de *Trifolium repens***

Plante herbacée rampante à stolons, à peu près glabre, dont les tiges atteignent 10 à 40 cm. Les feuilles sont à long pétiole, avec de grandes stipules blanchâtres et un peu membraneuses, pointues à leur sommet. Les folioles sont elliptiques, presque aussi larges que longues, denticulées, à nervures translucides, avec en général une tache blanche plus ou moins triangulaire en leur centre. Fleurs hermaphrodites groupées en têtes sphériques à long pédoncule. Elles sont en principe blanches, parfois rosées, à étendard érigé, pendantes lorsqu'elles commencent à se faner. Caractérisées par un petit calice à cinq dents. Les fruits sont des gousses bosselées et étroites à trois ou quatre graines (Tison et al.; 2014).



Figure 3 : Morphologie de *Trifolium repens* (Fleurs, graines et système racinaire)

II.1.2.2. *Trifolium campestre*

Trifolium campestre (Figure 4) pourrait-être d'origine méditerranéenne, elle est aujourd'hui cosmopolite, poussant en plaine et en altitude jusqu'à 1 400 mètres. Très largement répandue dans toute l'Europe occidentale, à l'exception des régions les plus froides et dans l'Afrique du Nord. Légèrement basophile, elle s'adapte aussi aux sols acides. On la rencontre dans les prés secs, les pelouses rocailleuses, au bord des chemins et sur les dunes. C'est un adventice de nombreuses cultures (<http://www.tela-botanic.org>)

- **Description botanique de *Trifolium campestre***

Plante annuelle, parfois bisannuelle herbacée basse (10 à 30 cm) et pubescente, à tige érigée et ramifiée. Feuilles assez peu nombreuses et alternes, pétiolées, avec des stipules ovales, légèrement renflées, à extrémité pointue. Folioles ovales à base rétrécie, finement dentées. La foliole terminale est portée par un assez long pétiole prolongeant le pétiole de la feuille (<http://www.tela-botanic.org>). Floraison de mai à septembre (Tison et al.; 2014),



Figure 4 : Morphologie de *Trifolium campestre* (Fleurs, graines et système racinaire)

- **Classifications des deux espèces**

Les trèfles appartiennent à l'ordre des *Fabales*, à la famille des *Fabaceae* et le genre de *Trifolium*, le tableau I montre la classification de chaque espèce étudiée.

Tableau I : Classification de *Trifolium campestre* et *Trifolium repens* (Ellison et al., 2006)

Règne : <i>Plantae</i>	Règne : <i>Plantae</i>
Sous-règne : <i>Tracheobionta</i>	Sous-règne : <i>Tracheobionta</i>
Division : <i>Magnoliophyta</i>	Division : <i>Magnoliophyta</i>
Classe : <i>Magnoliopsida</i>	Classe : <i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe : <i>Rosidae</i>	Sous-classe : <i>Rosidae</i>
Ordre : <i>Fabales</i>	Ordre : <i>Fabales</i>
Famille : <i>Fabaceae</i>	Famille : <i>Fabaceae</i>
Genre : <i>Trifolium</i>	Genre : <i>Trifolium</i>
Espèce : <i>Trifolium campestre</i> Schreber 1804	Espèce : <i>Trifolium repens</i> L. 1753

II.1.3. Intérêt de genre *Trifolium*

Un des grands intérêts du genre *Trifolium* est sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à des bactéries symbiotiques (*Rhizobium*) présentes dans des petits renflements, des nodosités, au niveau de leurs racines. Cette plante est très souvent utilisée comme engrais vert. On sème le trèfle sur une parcelle qui vient d'être labourée. Une fois la plante mature, on la retourne dans la terre pour l'enrichir et l'aérer, particulièrement dans le cas de sol pauvre, caillouteux ou argileux. (Williams, 1970)

Pour les animaux, la plante est utilisée comme fourrage pour le pâturage ou comme foin sec, et ils fournissent non seulement des protéines de haute qualité, mais aussi une variété de molécules biologiquement actives telles que des vitamines, et d'autres nutriments (Burris et Roberts, 1993).

Trifolium campestre et *Trifolium repens* sont utilisées pour leurs propriétés expectorantes, analgésiques, antiseptiques et également pour traiter les douleurs rhumatismales (Beck et al., 2005).

Le trèfle blanc est également une bonne source de minéraux et contient du calcium, du magnésium, du phosphore, et du potassium, et des oligo-éléments tels que le bore, le chrome, le fer, le cobalt, le cuivre, le sélénium, le zinc et le manganèse. Sa grande digestibilité a des effets diurétiques et régulateurs. Seul bémol, la plante en fleur contient des cyanures qui peuvent en grande quantité nuire à la santé des animaux. (Masterson et Sherwood, 1970).

Trifolium repens est une plante très mellifère à nectar très sucré. Elle constitue une ressource de nourriture aux abeilles à une période de l'année où les fleurs se font rares. Ses fleurs sont utilisées, en médecine traditionnelle, pour leurs vertus astringentes et vulnérinaires (Foury, 1954).

II.2. Partenaire microbien : Rhizobia

II.2.1. Généralités

Les rhizobia sont des bactéries du sol capable d'induire des nodules sur les racines ou les tiges de légumineuses et assurer la fixation de l'azote, ils obtiennent un approvisionnement stable en carbone dérivé des composés de la photosynthèse (Longfei Zhao et al., 2010). Les rhizobia existent en tant que saprophytes libres et dans une relation symbiotique à travers les légumineuses (Rai et al., 2014).

D'après Stpkowski et al. (2018), les rhizobia se répartissent en plusieurs genres comportant plusieurs espèces. Cette classification est en évolution, des espèces et des genres nouveaux sont découverts de plus en plus. Les principaux genres sont *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Azorizobium*, *Devosia*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*. En se basant sur la séquence d'ADN ribosomal 16S, les symbiotes des légumineuses décrites appartiennent à 2 principales sous classe phylogénétiques distinctes les alpha et beta protéobactéries (Aoki et al., 2013)

Ces genres se répartissent également en huit familles (Rhizobiacées, Phyllobacteriacées, Bradyrhizobiacées, Hyphomicrobiacées, Methylobactériacées, Brucellacées, Burkholderiacées et Ralstoniacées) et deux ordres, à savoir les rhizobiales et les burkholderiales. L'ordre des rhizobiales renferme les six premières familles.

Il y a certainement beaucoup à découvrir, puisque seulement 23% des légumineuses connues ont été identifiées spécifiquement pour la relation symbiotique à ce jour (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

III- Interaction légumineuse-rhizobia

L'interaction entre les légumineuses et les rhizobia entraîne la formation des nodules sur les racines (Okazaki et al., 2015), à l'intérieur desquels la bactérie se différencie en

bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Gibson et al., 2008) et le transféré à la plante. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie. C'est donc une véritable symbiose entre les deux partenaires (Giraud et al., 2007). La relation Rhizobia-légumineuse est plus grande avec d'autres organismes fixateurs d'azote en raison de son potentiel élevé (Deshwal and Chaubey, 2014). Le processus de formation des nodules est appelé nodulation (Brewin et al., 1992). Cette interaction légumineuse-rhizobia est assurée par un dialogue moléculaire (Terefework, 2002).

III.1. Dialogue moléculaire rhizobia-légumineuse

La symbiose rhizobia-légumineuse est le résultat de l'interaction complexe entre la bactérie et son hôte. Ces interactions débutent par une reconnaissance mutuelle faisant intervenir un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Les flavonoïdes libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire ; ils sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD (Spaink, 2000).

L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod (Lerouge et al., 1990 ; Dénarié et al., 1996), qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante (Kouchi et al., 2010). Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire. Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule (Dénarié et al., 1996 ; Perret et al., 2000).

III.2. Nodulation

L'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule, connue sous le terme « nodulation » (Figure 5) (Dénarié et al., 1996 ; Perret et al., 2000).

L'interaction entre les plantes légumineuses et les rhizobia induit la formation d'un nouvel organe, le nodule ; avec cette structure les bactéries se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote moléculaire pour le bénéfice de la plante (Xet al., 2000).

L'infection commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les rhizobia qui sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances principalement les lécithines (Kape et al., 1991 ; Waligora et al., 2008).

Dès la reconnaissance du rhizobia spécifique par la plante, des modifications structurales apparaissent dans les premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologies du poil absorbant : dépolarisation de la membrane plasmique, modification de concentration du Ca^{2+} intracellulaire, augmentation du pH et fragmentation de l'actine (Duhoux et Nicole, 2004). Une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite cross de berger à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient (Esseling et al., 2003). C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection. Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les rhizobia dans les cellules de méristème nodulaire (Duhoux et Nicole, 2004).

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins et al., 2003). Les rhizobia se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation de l'azote, nommées « bactéroïdes » (Raven et al., 2007).

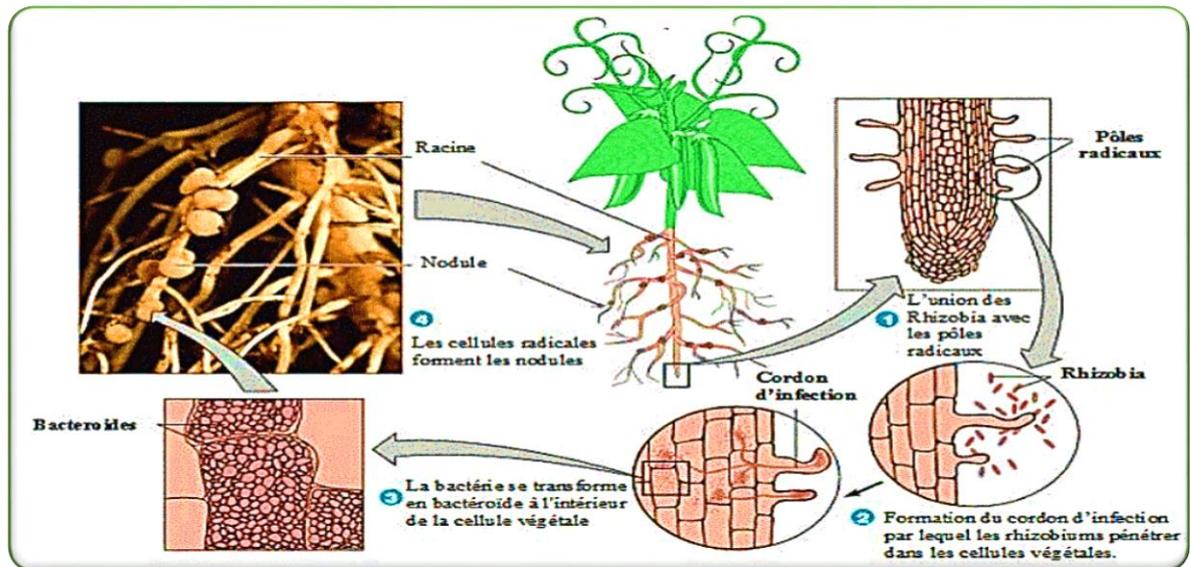


Figure 5 : Processus de la nodulation (Tortora et al., 2003)

Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane, nommée membrane pér bactéroïdienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses modifications métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont le microorganisme a besoin pour accomplir sa tâche principale : la fixation d'azote (Hopkins et al., 2003).

III.3. Fixation enzymatique de l'azote : la nitrogénase

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase qui est présent uniquement chez les *Eubacteria* et *Archaea* (Matthew et al., 2008).

Les nitrogénases (Figure 6) qui catalysent la réduction biologique du diazoté en ammoniac sont des métallos enzymes complexes. Ces enzymes contiennent deux composants, un petit dimère, connu sous le nom de fer (Fe) protéine, fonctionne comme un donneur d'électrons dépendant de l'ATP, un autre connu sous le nom de la protéine molybdène-fer (MoFe), contient le site catalytique enzymatique. Les gènes qui codent ces deux protéines et les autres protéines nécessaires à la réaction ou à sa régulation sont groupés dans un même opéron appelé *nif*. La protéine FeMo est un tétramère de 230 KDa codé par les gènes *nifD* et *nifK*. Elle contient le site réducteur du substrat. La protéine Fe est un homodimère de 64kDa codé par le gène *nifH*. C'est le composant donneur d'électrons qui contient le site de liaison de l'ATP (Halbleib et Ludden, 2000 ; Rees et Howard, 2000).

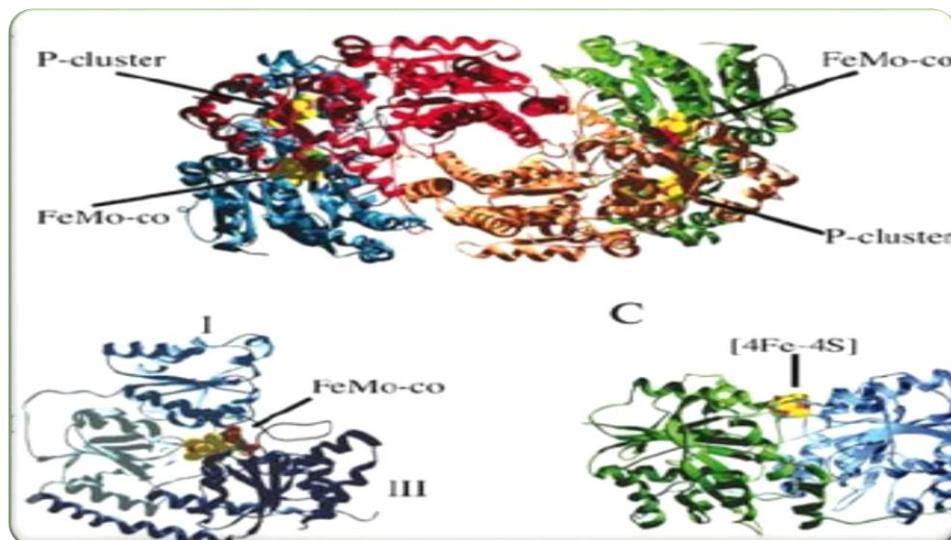


Figure 6 : Structure de la nitrogénase (Dixon et al., 2004)

La réaction catalysée par la nitrogénase est la suivante :



Le complexe nitrogénase peut également réduire les protons en dihydrogène, ce qui donne :



Le cycle de nitrogénase commence avec la liaison de deux molécules d'ATP à la protéine Fe réduite, ce qui provoque un changement conformationnel et permet le transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine FeMo. L'hydrolyse de deux ATP est couplée à ce transfert. Le complexe se dissocie ensuite, la protéine Fe est réduite par un donneur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine). Le cycle est répété jusqu'à ce que suffisamment d'électrons soient transmis à la protéine FeMo ce qui lui permet, par l'intermédiaire du molybdène de les transférer aux diazotées et de produire de l'ammoniac (Halbleib et Ludden, 2000).

À la fin de la réaction, l'ammoniac fixé est converti en glutamine, asparagine, uréides, etc., avant d'être transporté dans la sève du xylème pour son assimilation par la plante hôte. Cette conversion est possible grâce aux gènes *nif* et *fix* qui codent en partie pour la synthèse de différents enzymes catalyseurs comme le glutamate déshydrogénase, la glutamine synthétase (Yann, 2006).

Le complexe nitrogénase (Figure 7) est sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible. Cependant, des mécanismes biologiques existent pour protéger l'enzyme de l'oxygène. Il a été rapporté que la fixation de l'azote est un processus très coûteux en énergie ce qui impose une régulation. En effet, la transcription des gènes *nif* est réprimée par l'ammonium, et aussi par le dioxygène, qui rend la fixation impossible en inactivant la nitrogénase. Certains diazotrophes régulent également la fixation au niveau post-traductionnel en inactivant le complexe enzymatique dès que des quantités suffisantes d'ammonium sont présentées ou quand la quantité d'ATP disponible devient insuffisante (Halbleib et Ludden, 2000).

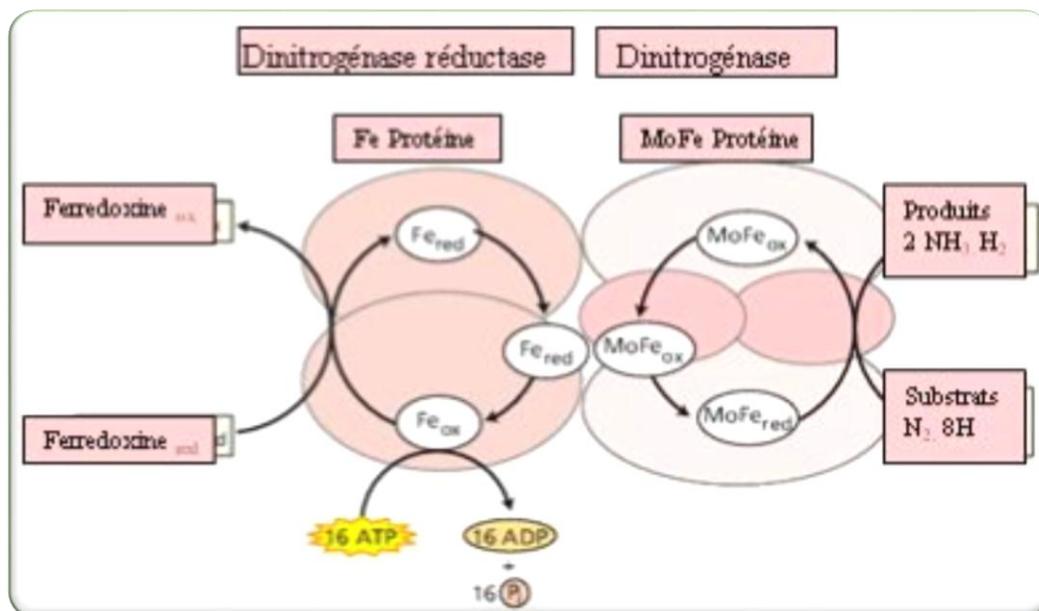


Figure 7 : Représentation schématique du fonctionnement du complexe nitrogénasique

IV. Méthodes d'études des rhizobia

L'étude de la diversité des rhizobia peut être réalisée par un ensemble des méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques ;

IV.1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries en utilisant des techniques standardisées. Les microorganismes sont caractérisés par une série de tests basés sur la vitesse de croissance, la tolérance aux variations de pH et aux concentrations en sels, la croissance à différentes températures, ainsi que d'autres tests (Zakhia et de Lajudie, 2006). Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différentes enzymes telles que l'indole-phénol oxydase, le nitrate réductase, l'uréase, ainsi que d'autres enzymes impliquées dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Jusqu' en 1970, la phénotypie a été exécuté comme technique de classification telle que les capacités d'un rhizobia à noduler des espèces de légumineuses. Cependant, cette taxonomie a échoué en raison des nombreuses exceptions dans cette règle (Zakhia et de Lajudie, 2001).

IV.2. Méthode numérique

La méthode numérique étudie un nombre important à la fois de caractères phénotypiques pour une seule souche, la présence du caractère est codée par 1, l'absence du caractère est codée par 0. Elle permet le rassemblement des individus semblables dans une classe de similitude. Cependant cette étude ne permet pas d'évaluer tout le potentiel génétique d'une bactérie (Sneath et al., 1975).

IV.3. Méthodes moléculaires

Elles englobent plusieurs techniques moléculaires telles que : la technique de typage par cible PCR (empreinte cible PCR) et notamment la technique des puces à ADN. Dans cette dernière technique, la conception des puces permet de détecter simultanément des milliers de séquences couvrant tout le génome d'un organisme (Lin, 2004).

D'autres nouvelles méthodes sont des alternatives potentielles aux méthodes basées sur l'ADN pour obtenir des résultats rapides et fiable. La méthode la plus utilisée est le laser assisté par matrice d'ionisation par désorption–spectrométrie de masse à temps vol (MALDI-TOF MS) qui a été suggérée comme la méthode rapide et fiable d'identification, basée sur le profil protéique caractéristique pour chaque microorganisme. En utilisant cette technologie, il a été estimé que 99% des souches testées sont correctement identifiées (Ferreira et al., 2001).

Matériels et Méthodes

Afin de pouvoir étudier les bactéries symbiotique nodulant *Trifolium campestre* et *Trifolium repens*, un isolement bactérien suivi de plusieurs tests évaluant divers paramètres physiologiques et biochimiques ont été réalisés.

Dans ce présent chapitre la méthodologie de travail adoptée pour répondre à l'objectif de cette étude sera décrite, depuis l'échantillonnage et le prélèvement, la constitution d'une collection d'isolats jusqu'à sa caractérisation physiologique et biochimique.

I. Échantillonnage

L'échantillonnage des plantes de *Trifolium repens* et *Trifolium campestre* (Figure 6) a été effectué à partir de deux sites à Targa Ouzemour, un au niveau du l'Université de Bejaïa, et un autre à la résidence universitaire, Wilaya de Bejaia, durant le mois d'Avril 2021, à cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines.



Photo de *Trifolium campestre*

Photo de *Trifolium repense*

Figure 8 : Photos de deux plantes de *Trifolium*

Le prélèvement des nodules est réalisé selon le protocole de Vincent (1970), tout l'appareil racinaire a été récupéré en creusant à environ 15 cm au tour de la plante et à 20 cm de profondeur, en laissant le sol attaché aux nodules et aux racines, afin d'éviter leur dessiccation. Vers la fin, les plantes ont été placées dans des sacs en plastique étiquetés puis transportés au laboratoire.

Des prélèvements de sols ont été effectués afin de procéder à une analyse pédologique pour mieux comprendre les conditions de développement de *Trifolium campestre* et *Trifolium repens* ainsi que leur partenaire symbiotique.

I.1. Analyse du pH et de l'humidité des sols

Les analyses ont été faites suivant les protocoles utilisés par le Centre d'Étude Phyto-Sociologique et Ecologique Louis Emberger de Montpellier, France (Emberger et Gordon, 1983).

Les échantillons de sol ont été séchés à l'air libre pendant quelques jours ; puis tamisés avec un tamis de 2 mm de diamètre.

- **Humidité du sol**

L'humidité du sol est la quantité d'eau contenue dans le sol au moment du prélèvement. Elle est mesurée par rapport à la quantité de terre sèche contenue dans ce sol, et exprimée en % ($H_2O / 100g$ de terre sèche). Pour cela, 20 g de chaque échantillon ont été pesés avec précision dans une boîte en verre. Après séchage à l'étuve à 105° C pendant 15 heures, la boîte est pesée à nouveau. Le pourcentage de la teneur en eau est calculé selon la formule ci-dessous :

$$H\% = \left(P_1 - \frac{P_2}{P_2} \right) \cdot 100$$

$H\%$: Pourcentage de la teneur en eau ;

P_1 : Masse de l'échantillon de sol humide ;

P_2 : Masse de l'échantillon de sol sec.

- **pH du sol**

Le potentiel en Hydrogène (pH) est le logarithme de l'inverse de la concentration des ions H^+ dans une solution ($pH = -\log [H^+] = \log 1/[H^+]$). Le pH des échantillons de sol prélevés a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre combinée.

Une suspension aqueuse du sol dont le rapport sol/eau = 1 /2,5 a été préalablement préparée et laissée sous agitation pendant 2 h. Après ce temps, une première mesure a été prise, elle correspond au pH_{eau} . Par la suite, la suspension est supplémentée de 3 ,72 g de

chlorure de potassium (KCL) puis agitée pendant 30 min jusqu'à dissolution totale du sel. Une mesure du pH a été à nouveau effectuée, elle correspond au pH_{KCL}.

II. Isolement et constitution d'une collection bactérienne

Une fois au laboratoire les racines de *T.campestre* et *T.repens* ont été débarrassées du sol en faisant plusieurs lavages délicats avec de l'eau du robinet, afin de ne pas endommager les nodules. Par la suite, les nodules racinaires ont été découpés individuellement tout en laissant une partie de la racine pour éviter l'infiltration de l'eau de Javel à l'intérieur au moment de la stérilisation (Vincent, 1970).

II.1. Désinfection des nodules

En respectant les conditions d'asepsie, les nodosités ont été immergées dans de l'éthanol 90% pendant 30 secondes, puis transférées rapidement dans l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) à 3% pendant 2 minutes, suivies par une série de rinçage (10 fois) avec de l'eau distillée stérile. Après s'être débarrassé de la partie racinaire, chaque nodule a été transféré dans un tube Eppendorf stérile (Vincent, 1970).

II.2. Efficacité de la désinfection des nodules

Afin de vérifier l'efficacité de la stérilisation superficielle des nodules, un des nodules préalablement stérilisés a été placé au centre d'une boîte Pétrie contenant le milieu YMA puis incubé à 28 °C pendant plusieurs jours pour voir s'il y aura une croissance bactérienne ou mycélienne.

II.3. Ensemencement et purification des isolats

Les nodules ont été écrasés à l'aide d'une tige métallique préalablement stérilisée, puis le broyat nodulaire obtenu a été ensemencé sur le milieu YMA (Yeast mannitol Agar) (Annexe I) et incubé à 28°C pendant quelques jours (Vincent, 1970). La purification des isolats a été faite par repiquage successif sur le même milieu YMA jusqu'à l'obtention de culture pure (Vincent,1970).

II.4. Conservation des isolats

Afin de conserver les isolats, des cultures bactériennes ont été préparées dans des tubes à essai contenant 5 ml du bouillon YMB (Annexe II) et incubé à 28°C pendant 3 jours. Par la suite, 800 µl de ces cultures liquides ont été prélevés et additionnés de 200µl de glycérol stérile dans des eppendorfs, puis homogénéisés et stockés à - 80°C.

II.5. Test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Test du 3-cétolactose)

Le test du 3-cétolactose permet de distinguer entre le genre *Agrobacterium* et *Rhizobium* ; deux genres bactériens très semblables dans leur aspect morphologique sur milieu YMA. Il se base sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides (Bernaerts et De Ley, 1963 ; Jordan ,1984).

Les isolats sont incubés à 28 °C, pendant 3 jours sur milieu M1 glucosé (Annexe I). Puis avec une anse de platine un échantillon a été prélevé de la culture, le milieu M2 lactosé (Annexe I) a étéensemencé et incubé à 28 °C pendant 48h. Après croissance bactérienne, les boîtes ont été inondées avec le réactif de Benedict (Annexe I), puis incubées à température ambiante pendant une heure.

Au bout d'une heure de temps, la présence d'un halo jaune au tour des colonies indique la présence de la 3-cétoglucosidase produite uniquement par le genre *Agrobacterium*. Par contre, l'absence de halo signifie que la souche étudiée n'est pas un *Agrobacterium*.

II.6. Authentifications des isolats

Un test de nodulation simple a été réalisé dans le but de tester la capacité de réinfection des souches isolées sur leur plante hôte à savoir *T.repens* et *T. campestre*. Le protocole comporte trois étapes essentielles :

II.6.1. Désinfection des graines

Sous une haute à flux laminaire, les graines de *T. repense* et *T. campestre* ont été stérilisées et scarifiées avec de l'acide sulfurique (H₂SO₄) pendant 30 min, suivi d'une série de lavages (10 fois) avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toutes traces d'acide.

II.6.2. Germination des graines

Après stérilisation, les graines ont été transférés dans des boîtes de Pétrie en verre contenant du papier absorbant préalablement imbibé avec de l'eau distillée stérile et en respectant les conditions d'asepsie, les boîtes ont été mises à l'obscurité à 20°C jusqu'à germination des graines.

II.6.3. Préparation des cultures bactériennes et inoculation des plantules

Après germination des graines, les plantules ont été transférées aseptiquement dans des tubes contenant le milieu Jensen (Annexe I) stérile puis inoculées avec 1 ml (10^8 cellules/ml) des suspensions des souches pures. Les plantules inoculées ont été mises à température ambiante sous une luminosité contrôlée pendant plusieurs semaines et la nodulation est suivie par observation de l'apparition des nodules sur la partie racinaire. Le test est réalisé en trois répétitions et un témoin négatif sans inoculation a été inclus.

III. Caractérisation phénotypique des isolats

Les souches isolées de *T. repense* et *T. campestre* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique par une série des tests morphologiques, physiologique et biochimique. Une souche de *Lotus corniculatus* (LcT1) est utilisée comme souche de référence dans cette étude.

III.1. Caractérisation morphologique des colonies

L'observation des colonies formées par les isolats de *T. repense* et *T. campestre* sur milieu YMA après 3 jours d'incubation à 28 °C a permis de les caractériser morphologiquement. Elles ont été décrites selon plusieurs critères à savoir : la forme, la taille, la couleur, l'opacité, la production d'exopolysaccharides (EPS) et la durée d'apparition des colonies.

III.2. Caractérisation cellulaire des isolats

La forme et la mobilité des isolats ont été déterminées par observation à l'état frais sous microscope optique (X40) des cultures âgées de 3 jours. Le Gram des isolats a été déterminé par observation au microscope (X100) des frottis préparés selon le protocole mis au point par Gram (1884). (Annexe II).

III.3. Caractérisation physiologique des isolats

Les souches isolées ainsi que la souche de référence ont subi une série de tests physiologiques afin d'évaluer leur croissance dans des conditions différentes de température, de pH et de NaCl.

Pour tous les tests, les milieux sont inoculés avec 10^7 cellules/ml de la culture bactérienne. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque test. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde (DO) $\lambda=600$ nm.

III.3.1. Effet de la température sur la croissance des isolats

L'effet de la température sur la croissance des isolats ainsi que la souche de référence a été étudié sur milieu YMB. Après inoculation, les tubes ont été incubés pendant 3 jours à différentes températures à savoir : 26 °C, 28 °C, 30 °C et 37 °C.

III.3.2. Effet de pH sur la croissance des isolats

L'effet du pH sur la croissance des isolats ainsi que la souche de référence a été étudié en utilisant des cultures sur milieu YMB ajustés à différent pH (4, 6, 8). Les tubes inoculés ont été incubés pendant 3 jours à 28 °C.

III.3.3. Effet du NaCl sur la croissance des isolats

L'effet du NaCl sur la croissance des isolats a été déterminé en cultivant les isolats de *Trifolium* ainsi que la souche témoin sur milieu YMB préparé à différentes concentrations en NaCl : 1%, 2%, 3% et 4%. Les tubes inoculés ont été étuvés à 28 °C pendant 3 jours.

III.4. Caractérisations biochimiques

Les tests biochimiques sont réalisés suivant les protocoles décrits par Marchal et al. (1982). Les tests ont porté sur la recherche de : catalase, nitrate réductase, citrate perméase, β -galactosidase, fermentation du glucose, saccharose et du lactose, production de sulfure d'hydrogène (H_2S), production d'acide et/ou d'acétoïne, production d'indole, hydrolyse de l'urée et utilisation du mannitol.

III.4.1. Recherche de la nitrate réductase

La révélation de la réduction des nitrates par ces isolats est faite par ensemencement du bouillon nitraté suivi d'une incubation à 28 °C pendant 3 jours. La culture est par la suite additionnée du réactif de Griess NRI (acide sulfanilique) et NRII (a-naphtylamine). Après addition des réactifs, l'apparition d'une coloration rouge indique que les souches ont une nitrate réductase (NR^+); dans le cas contraire, la poudre de zinc est ajoutée : la couleur rouge

signifie la non réduction des nitrates (NR^-) alors qu'un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, signifiant ainsi que la souche possède une nitrate réductase donc (NR^+).

III.4.2. Recherche de la citrate perméase

La mise en évidence du citrate perméase chez les isolats étudiés ainsi que la souche de référence (LcT1) est réalisée sur milieu citrate de Simmons incliné contenant le citrate comme seule source de carbone. La pente du milieu a étéensemencée en stries serrées à partir de colonies prélevées sur YMA puis incubées à 28 °C pendant 3 jours. Le virage de l'indicateur de pH du vert au bleu indique l'alcalinisation du milieu et donc la présence de la citrate perméase (réaction positive).

III.4.3. Recherche de la catalase

L'activité catalasique des isolats a été déterminée par dépôt d'une colonie bactérienne, prélevée sur milieu YMA, sur une lame additionnée d'une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La production d'une effervescence à savoir dégagement de gaz indique la présence d'une catalase.

III.4.4. Production de l'indole

Le milieu utilisé pour ce test est l'eau peptone exempte d'indole, ce dernier riche en tryptophane permet de détecter la présence de la tryptophane-désaminase qui dégrade le tryptophane en indole. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne. Après 3 jours d'incubation à 28 °C, quelques gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutées. L'apparition d'un anneau rouge en surface est retenue comme un résultat positif.

III.4.5. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et la souche de référence (LcT1) sont cultivés sur milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012g de Rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu sans urée est autoclavé, puis refroidi jusqu'à environ 45 °C. La solution d'urée est stérilisée par filtration puis ajoutée au milieu sous la hotte à flux laminaire. Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 3 jours. Une couleur rouge due à l'alcalinisation du milieu indique l'hydrolyse de l'urée.

III.4.6. Fermentation d'acétoïne et production d'acide

La fermentation du glucose a été étudiée en milieu Clark et Lubs inoculé par les isolats bactériens et la souche de référence(LcT1). Après 3 jours d'incubation à 28 °C, le milieu est divisé en deux dans des tubes à hémolyse. Quelques gouttes du réactif VP1 et VP2 sont ajoutées dans le premier tube, alors que la réaction dans le deuxième tube est révélée avec le rouge de méthyle.

La production de l'acétone à partir du glucose se traduit par :

- Une coloration du milieu au rouge cerise indiquant une réaction positive (VP+).
- Une coloration du milieu au jaune citron indiquant une réaction négative (VP-).

Si la souche fermente le glucose et produit de l'acide, on obtient :

- Une coloration du milieu au rouge indiquant une réaction positive (RM+).
- Une coloration du milieu au jaune indiquant une réaction négative (RM-).

III.4.7. Fermentation du glucose, saccharose, lactose, production de gaz et d'H₂S

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) nous renseigne sur la dégradation des sucres qui est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH. Le thiosulfate est réduit en sulfures d'hydrogènes (H₂S) par certaines bactéries. Ce dernier réagit avec un sel de Fer pour donner un précipité noir.

La pente de la gélose estensemencée par stries serrées et le culot par piqûre centrale profonde. L'incubation se fait à 28 °C pendant 3 jours. La lecture se fait comme suit :

- Fermentation du lactose et/ou du saccharose : virage au jaune de la pente.
- Fermentation du glucose : virage du culot au jaune.
- Production de gaz : apparition de bulles de gaz.
- Production d'H₂S : noircissement de milieu.

III.4.8. Recherche de la β-galactosidase

La β-galactosidase est une enzyme qui dégrade le lactose en glucose et galactose. Cette enzyme est intracellulaire et inductible. Le test consiste à mettre en contact la bactérie avec un analogue structural du lactose (ONPG).

Un disque imprégné d'ONPG est introduit dans un tube à essai contenant 5 ml d'une culture bactérienne sur milieu YMB. Suivi d'une incubation des tubes à 28°C pendant 3 jours. Une coloration jaune indique un test positif et donc la présence d'une β -galactosidase.

Résultats et discussions

I. Aspect des nodules prélevés

Les nodules prélevés sur le système racinaire (Figure 7) de *Trifolium repens* et *Trifolium campestre* sont unilobés avec une forme allongée de 3 à 6 mm, aux contours réguliers et de surface rugueuse. Ils sont de couleur rose à brune due à la présence de la légghémoglobine, hémoprotéine transporteuse d'oxygène qui facilite la diffusion de ce dernier aux bactéroïdes, car la nitrogénase bactérienne est très sensible à une concentration élevée en oxygène (Dowine, 2005). Le nombre de nodules par pied était variable allant de 4 à 12 nodules.



Figure 9 : Aspect morphologique des nodules racinaires de *T. repens*, et *T. campestre*

II. Détermination du pH et de l'humidité des sols

Les résultats des mesures de pH et l'humidité des sols étudiés ont été mentionnés dans le tableau II

Tableau II : Valeurs des pH et l'humidité des sols échantillonnés dans la région de Bejaïa

Paramètres	Sites	
	RU.Targa Ouzemour	Campus Targa Ouzemour
Humidité (%)	12.87	2.88
pH _{eau}	7.85	7.80
pH _{KCl}	7.16	6.95

- **Humidité**

La teneur en humidité du sol du site de la résidence universitaire Targa Ouzemour est relativement plus importante avec 12.87% par rapport à celle du site du Campus Targa

Ouzemour avec 2.88%. En effet ce résultat est à l'opposé de ce qui a été rapporté concernant *Trifolium campestre* décrite comme légumineuse qui se développe sur des sols plutôt humides (Issolah.1991).

- **pH du sol**

En prenant en considération les normes établies par Soltner (1988), il apparaît que les sols des deux sites : la résidence universitaire Targa Ouzemour et le campus Targa Ouzemour sont légèrement alcalins avec des valeurs de pH_{eau} de 7.85 et 7.80 respectivement.

Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Issolah et al. (2015) qui ont indiqué que les trèfles se développent majoritairement sur des sols à pH variable (légèrement acide, neutre, légèrement alcalin, alcalin) allant de 6,46 à 8,64. De plus, la plupart des légumineuses nécessitent des valeurs de pH neutre ou légèrement acide pour une bonne activité symbiotique (Bordeleau et Prévort. 1994).

III. Constitution d'une collection d'isolats

III.1. Résultats de l'isolement

L'isolement bactérien à partir des nodules collectés a permis de constituer une collection de vingt-sept isolats bactériens. La nomenclature choisie pour ces isolats correspond à « Tc » relatif à *Trifolium campestre*, « Tr » relatif à *Trifolium repens*, suivi de « n° » le numéro correspondant à la souche. De plus, les isolats ont été retenus après avoir confirmé l'efficacité de la stérilisation superficielle des nodules (Figure 8).



Figure 10 : Résultat de test de stérilité des nodules

III.2. Distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Test du 3-cétolactose)

Après l'addition du réactif de Benedict aux colonies âgées de 3 jours, aucun halo jaune n'a été observé autour de ces colonies (Figure 9), ces résultats sont expliqués par

l'absence de production de la 3-cétoglucosidase; enzyme qui oxyde le C3 du glycosyl des saccharides, présente chez *Agrobacterium*. Ce résultat permet de déduire que les isolats testés n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium*. Le même résultat est obtenu par Benhizi (2006) avec les bactéries nodulants les légumineuses du genre *Hedysarum* et de Lajudie (1998) pour le genre *Allorhizobium*.

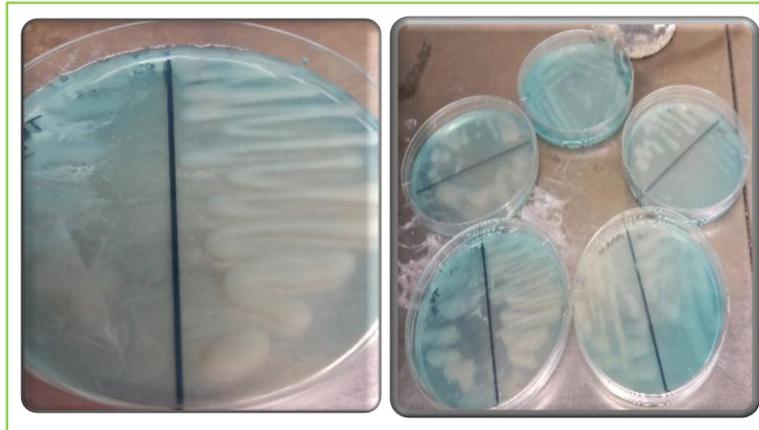


Figure 11 : Résultats du test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

III.3. Authentification des isolats

Après inoculation des plantules de *Trifolium campestre* et *T. repens* avec les souches isolées on a observé que ces dernières se sont développées et ont commencé à noduler. Le dénombrement des nodules n'a pas été fait puisque le test est toujours en cours.

IV. Caractérisation phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées (Vandamme et al., 1996). Elle est basée sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham et al., 1991).

IV.1. Caractérisation morphologique et cellulaire

IV.1.1. Caractérisation morphologique

Après 3 jours d'incubation à 28°C, des colonies ont été observées sur milieu YMA, elles se distinguent en trois morphotypes (A, B, C) (Figure 10). Elles sont opaques, lisses, circulaires aux contours réguliers, avec une surface semi-bombée à bombée, de couleur

beige, blanche ou jaune, d'un diamètre qui varie entre 0.1 à 2 mm et elles sont productrices d'exo-polysaccharides. Ces caractéristiques morphologiques répondent aux critères des rhizobia à croissance rapide et lente rapportés par Vincent (1970) et Jordan (1982,1984).

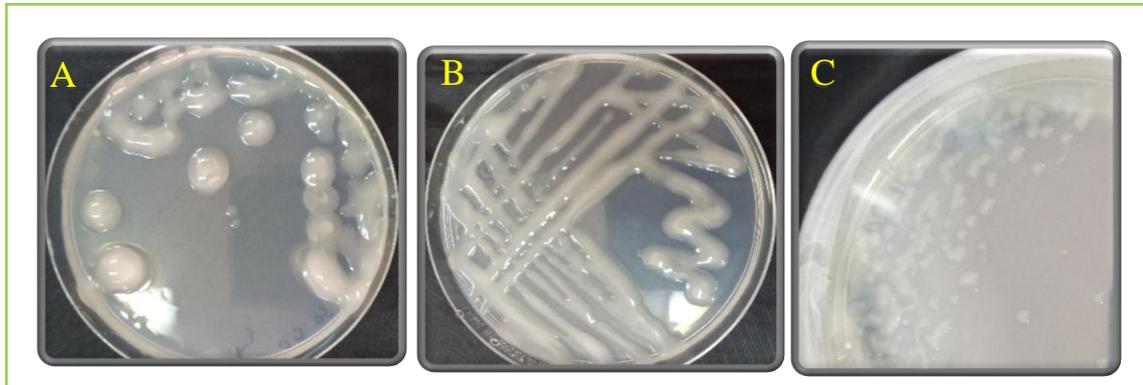


Figure 12 : Aspect des colonies formées par les isolats de *T. repens* et *T. campestre* sur milieu YMA

IV.1.2. Caractérisation cellulaire

L'observation microscopique à l'état frais des cultures âgées de 3 jours sur le milieu YMA, a permis de révéler que l'ensemble des isolats étudiés sont mobiles et de taille variable.

La coloration de Gram a montré qu'il s'agit de petits bacilles aux extrémités arrondies appartenant au groupe des bactéries à Gram négatif (Figure 11). Cette description concorde avec celle rapportée dans la littérature concernant les rhizobia (Vincent, 1970 ; Jordan, 1982,1984 ; et Jarvis et al., 1997).

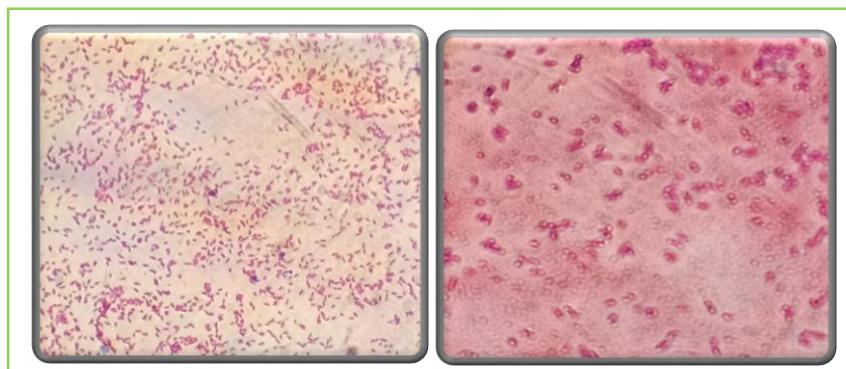


Figure 13 : Exemple d'une observation microscopique de frottis des isolats sous microscope optique (G X100)

IV.2. Caractérisation physiologiques des isolats

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la température, du NaCl et du pH sur la croissance des rhizobia isolées des nodules racinaires de *T. repens* et *T. campestre*. Les isolats ont été incubés dans le milieu YMB pendant 3 jours. Les valeurs données représentent la moyenne des trois répétitions pour tous les isolats y compris la souche de référence (LcT1) et pour chaque test.

IV.2.1. Effet de la température sur la croissance

Les résultats de l'effet de la température sur la croissance des isolats étudiée sont montrés dans la figure 12 et (Annexe III), la plupart des isolats y compris la souche de référence (LcT1) présentent une bonne croissance entre 26°C et 30°C avec un optimum de croissance situé à 28°C. Il est à noter que les souches Tr8-8, Tr1-1, Tr2-2, Tr7-7 sont inhibées à 26°C et remarquablement les souches Tr3-3, Tc1⁰⁴, Tr10, Tr6 continuent leur croissance même à 37°C.

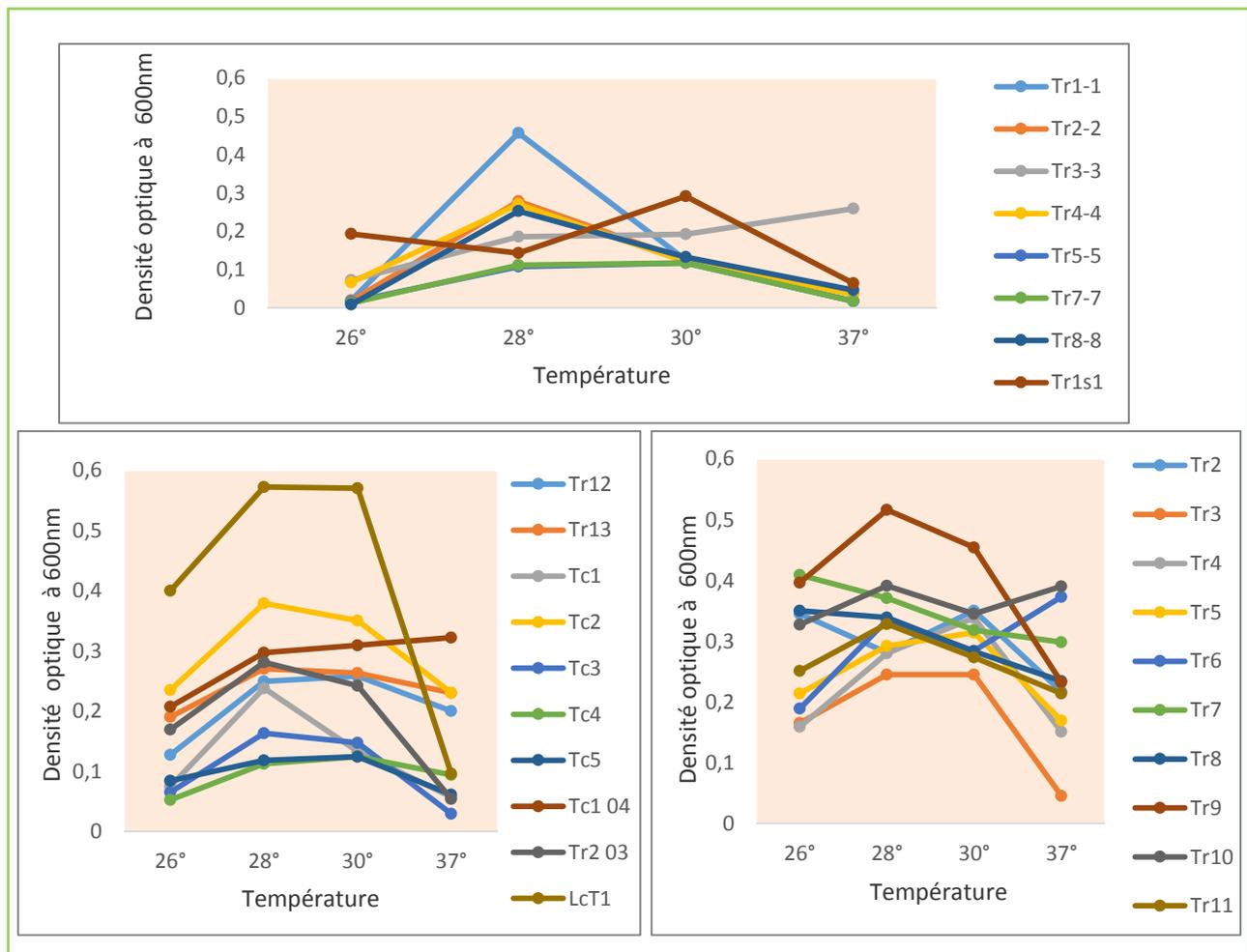


Figure 14 : Résultats de l'effet de la température sur la croissance des souches étudiées

Il est à rappeler que les rhizobia ont un optimum de croissance à des températures situées entre 28°C et 30°C et 37°C la croissance est nettement affectée (Zahran, 1999 ; Graham, 1992). En effet, les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes métaboliques des bactéries (Cloutier et al., 1992).

IV.2.2. Effet du pH sur la croissance

La capacité des bactéries nodulant *T. repens* et *T. campestre* à croître dans différents pH a été évalué. Les résultats (Figure 13, Annexe III) montrent qu'à pH 4 aucune croissance n'a été observée, suggérant la sensibilité des isolats ainsi que la souche de référence au pH acide (Tunrr NcroN et al., 1983). Les optimums de croissance se situent entre pH 6 et pH 7, à l'exception de certains isolats qui présentent une meilleure croissance à pH 8.

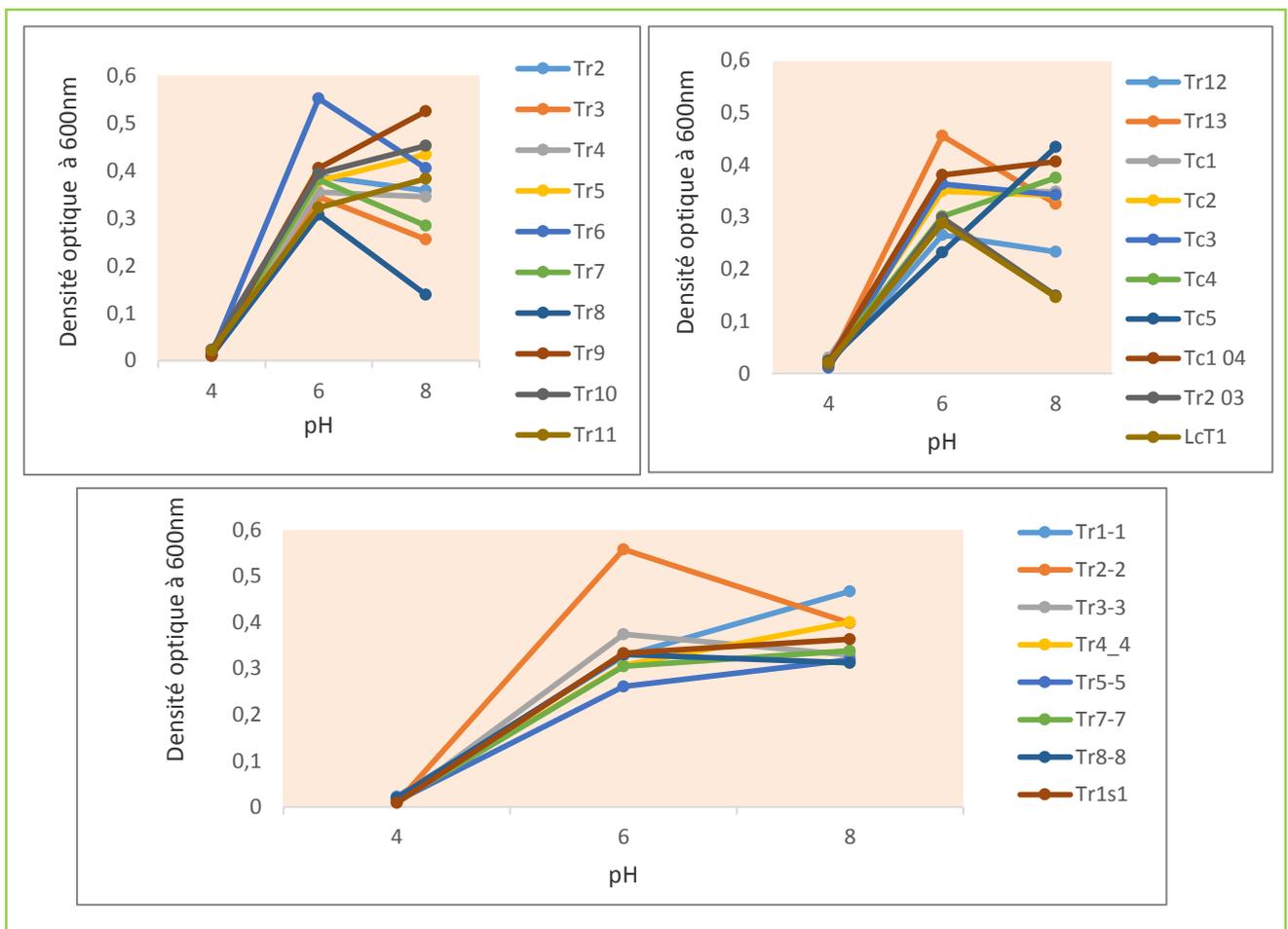


Figure 15 : Résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiées

Glen et Dilworth, (1994) ; Correa et Bameix, (1997) ; Graham, (1994) a rapporté que les souches de la même espèce de rhizobia peuvent varier considérablement dans leurs

tolérances au pH. Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de la croissance des rhizobia est entre pH 6 et pH 7. En général, les rhizobia sont des bactéries neutrophiles (EL-Hilali, 2006).

IV.2.3. Effet de NaCl sur la croissance

L'effet du NaCl sur la croissance des isolats est mentionné dans la figure 14 (Annexe III). Une diversité de réponse au NaCl a été remarquée. En effet, certaines souches sont capables de croître jusqu'à 4% NaCl bien qu'elle soit affectée. Alors que d'autres y compris la souche de référence (LcT1) sont inhibées à 1% NaCl. Selon Cacciar et al. (2003), la tolérance des rhizobia à des concentrations de NaCl ne dépasse pas 1%.

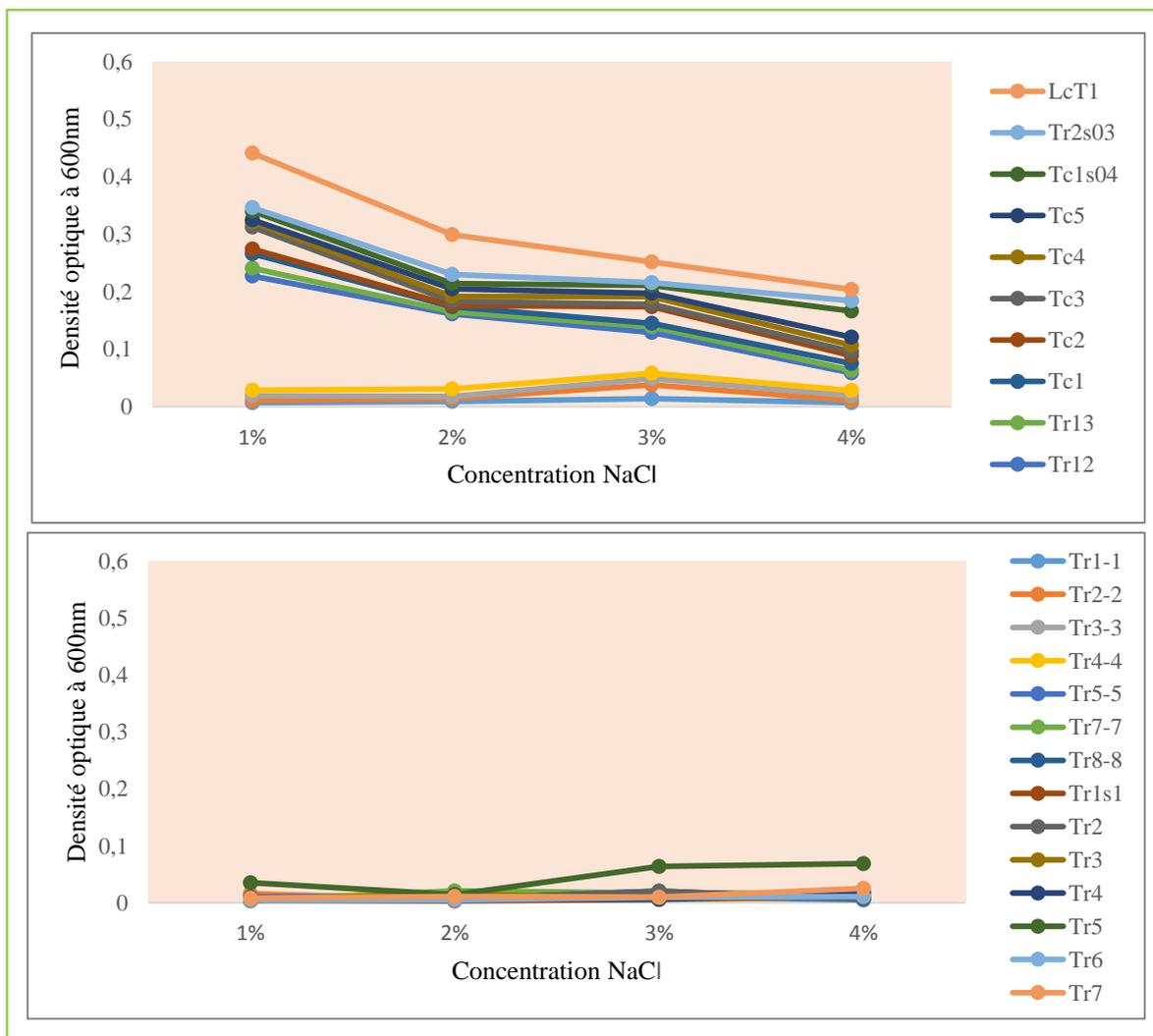


Figure 16 : Résultats de l'effet du NaCl sur la croissance les souches étudiées

La présence du NaCl provoque la synthèse des exo polysaccharides par les rhizobia qui sont utiles dans l'adaptation aux conditions de stress salin (Hung et al., 2005). En outre, d'autres rhizobia s'adaptent à cette contrainte par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes ou osmoprotecteurs (Zahran ,1999). De plus la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion d'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah et al., 2001).

IV.3. Caractérisation biochimique

Tableau III : Résultats des tests biochimiques des bactéries isolées de *T. repens* et *T. campestre* et la souche témoin (LcT1)

Souches	NR	VP	RM	Indole	Citrate perméase	Urée	ONPG	Catalase	Lactose	Saccharose	Glucose	Gaz	H ₂ S
Tr1-1	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr2-2	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr3-3	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr4-4	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tr5-5	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr7-7	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr8-8	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr1 ^{s1}	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr2	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Tr3	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tr4	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tr5	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tr6	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Tr7	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tr8	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tr9	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Tr10	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr11	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Tr12	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Tr13	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Tc1	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tc2	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tc3	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tc4	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tc5	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Tc1 ⁰⁴	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tr2 ⁰³	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
LcT1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

À partir des résultats du tableau III, on constate que l'ensemble des isolats testés partagent des caractères en commun ;

La majorité des souches n'ont pas révélé d'une coloration rouge après l'addition des gouttes des réactifs NRI et NRII, à l'exception des souches Tr5, Tc1, LcT1 qui possédant la nitrate réductase. L'apparition d'une coloration rouge après l'ajoute de la poudre de zinc dans les cultures négatives se traduit par la présence des ions nitrites et donc l'absence d'une nitrate réductase. Lucinski et al. (2002) ont montré que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses.

Les résultats du test réalisé sur le milieu Citrate de Simmons est négatif pour tous les isolats ce qui signifie l'inaptitude de ces dernières à métaboliser le citrate comme seule source de carbone et donc l'absence d'une citrate perméase, de plus ces isolats ne produisent pas l'indole à partir du tryptophane donc elles ne possèdent pas de tryptophanase responsable de la production de l'indole à partir du tryptophane à l'exception de la souche de référence.

L'apparition d'une coloration rose dans le milieu additionné d'urée après 3 jours d'incubation se traduit par la présence d'une uréase qui dégrade l'urée et libère des ions d'ammonium (Guiraud, 1998). L'activité uréasique est une propriété très répandue dans le monde bactérien et se traduit par la libération de l'ammonium important dans le domaine agricole (Mobly, 1992).

L'activité catalytique a été trouvée chez tous les isolats étudiés et qui se traduit par la formation immédiate de bulles gazeuses issues de la dégradation de l'eau oxygénée. Selon Vincent (1970), la présence de la catalase est l'une des caractéristiques principales chez les rhizobia. Tous les isolats ne produisent pas de l'acétoïne à partir de l'acide pyruvique (VP-), ce qui indique qu'elles n'utilisent pas la voie de fermentation butylène glycol. Ce résultat est confirmé par le test (RM+) et affirme que ce sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butane-dioïque. L'enzyme β -galactosidase qui a pour rôle d'hydrolyser des β -galactosides en oses simples est absente chez la majorité des souches. Certaines souches sont capables de fermenter le lactose le saccharose et le glucose et aucune souche ne produit le gaz et le H₂S.

D'après nos résultats nous isolats appartiennent au rhizobia.

*Conclusion et
Perspectives*

L'association symbiotique fixatrice d'azote est très diversifiée, la plus connue et la mieux étudiée est celle des rhizobia-légumineuses. Le présent travail a pour objectif principal l'isolement et la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses fourragères du genre *Trifolium* (*Trifolium campestre* et *Trifolium repens*), qui sont prélevées à partir de deux sites à Bejaia, le premier au Campus universitaire et un second à la résidence universitaire située à Targa Ouzemour.

Dans cette étude la mise en évidence du contenu nodulaire de *T. campestre* et *T. repens* a été réalisée et a permis d'isoler vingt-sept souches bactériennes. La caractérisation cellulaire et morphologique de ces isolats a révélé que ces derniers présentent les mêmes caractères que les rhizobia, se distinguant en trois morphotypes. Il a aussi été conclu que ces souches n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium* grâce aux résultats négatifs du test du 3-cétolactose, confirmé également par les résultats positifs du test d'authentification, suggérant ainsi leur appartenance au rhizobia.

La caractérisation physiologique a montré que la plupart des souches tolèrent les pH basiques, les optima de croissance sont situés à pH 6 et à température 28°C. Au-delà de 1% NaCl, la croissance de la majorité des souches est affectée.

La caractérisation biochimique a révélé une diversité de réponse en fonction des tests et des souches. La plupart des souches ne possèdent pas une nitrate réductase et une catalase. Elles ne produisent pas de l'acétoïne, mais des acides organiques. En revanche, elles sont capables d'hydrolyser l'urée grâce à une uréase.

Enfin, et en perspectives, il serait souhaitable :

- D'étudier la résistance de ces souches en présence des antibiotiques et des métaux lourds ;
- De pousser les tests effectués en utilisant d'autres gammes de pH, température, salinité ;
- D'étudier la capacité de ces isolats à assimiler les sucres et les acides aminés ;
- De compléter cette étude par une approche génotypique en utilisant les techniques de biologie moléculaire (PCR/RFLP de l'ADNr 16S, des gènes symbiotiques, des gènes de ménage, séquençage, hybridation), afin de déterminer avec précision la position taxonomique de ces isolats.

*Références
bibliographiques*

A

Allen O.N. & Allen E.K., (1981). The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses, and nodulation. University of Wisconsin Press. Madison. Aminés chez 2 souches de *Rhizobium meliloti*. Mémoire de DES. University d'Oran (p 66).

Aoki S., Ito M. & Iwasaki W., (2013). From β -to α -proteobacteria: the origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nod* II. *Molecular biology and evolution*, 30 (11), 2494-2508.

Arp D.J., (2000). The nitrogen cycle. In. *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*, chapter 1, Triplett E.W. (Ed.) Norfolk, Horizon Scientific Press. England, 1-14.

B

Beck V., Rohr U. & Jung Bauer A., (2005). Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 94, 499–518.

Benhizia Y., (2006). Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf. et *H. pallidum* Desf. Thèse de Doctorat d'Etat en Microbiologie appliquée de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.

Benson D.R. & Silvestre W.B., (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Review*. 57 (2), 293-319.

Bernaerts M. J. & De Ley J., (1963). A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*, 197(4865), 406-407.

Berada.H. & Fikri-Benbrahim K., (2014). Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *Microbiology Research Journal International*, 4 (6), 616-639.

Bordeleau L. M. & Prévost D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and soil*, 161(1), 115-125.

Brewin N.J., Downie J.A. & Young J.P.W., (1992). Nodule formation legumes. In *Encyclopedia of microbiology*, Joshua Lederberg, M.R (Ed) Rockefeller, University New York 3. USA, 239-248.

Burris R.H. & Roberts G.P., (1993). Biological nitrogen fixation. *Annual review of nutrition*. 13 (1), 317-335.

C

Cacciar I.E., Di Mattia P., Quatrini M.C., Moscatelli S., Grego D., Lippi M.R. & de Paolis (2003). Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress : Un arbre au désert *Acacia raddiana* Paris, 183-200.

Cloutier J.D., Prévost P., Nadeau, M & Antoun H., (1992). Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Applied Environmental Microbiology* 58, 2846-2853.

Correa O.S., Barneix A.J., (1997). Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (13). 153-157.

D

Deshwal VK, Chaubey A (2014). Isolation and characterization of *Rhizobium leguminosarum* from root nodule of *Pisum sativum* L. *J Acad Indus Res*, 2:464-7.

De Jensen C. E., Percich J. A., & Graham P. H., (2002). Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Research*, 74(2), 107-115.

De Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B. & Gillis M., (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov, sp. nov. Nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 48, 1277–1290.

Dénarié J., Debellé F & Promé J. C., (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*, 65 (1), 503-535.

Dixon R. Kahn D., (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *National Review Microbiol.* 4, 621-631.

Dowine J.A., (2005). Legume hemoglobin's: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current biology*, 6, 196-198.

Ducerf G. & Thiry C., (2003). Les plantes bio-indicatrices: guide de diagnostic des sols. (Ed) Promo nature, p 278.

Duhoux È. & Nicole M., (2004). Biologie végétale : associations et interactions chez les plantes: premier cycle, prépas, CAPES, Pharmacie. (Ed) Dunod. Paris. p 166.

E

El-Hilali I., (2006). La symbiose *Rhizobium*-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat Université Mohammed V-AGDAL. (p 150)

Ellison N.W.,Liston A., Steiner J.J., Williams W.M. & Taylor N.L., (2006). Molecular phylogenetic of the clover genus (*Trifolium*-Leguminose). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 688 -705.

Elmerich C., (1993). Fixation de l'azote et interactions bacteries-plantes. www.pasteur.fr.

Emberger, L. & Gordon, M. (1983). Centre d'études phyto-sociologiques et écologiques (Montpellier). Vade-Mecum pour le relevé méthodique de la végétation de et du milieu : Extrait du code pour le relevé méthodique de la méthodique de la végétation et du milieu. Editions du centre national de la recherche scientifique.

Esseling J.J.,Lhuissier F.G.P.,& Emons A.M.C., (2003). *Nod* factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of *Nod* Factor Application. *Plant Physiology* (132), 1982-1988.

F

Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Gracia-Fraile P., Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E., González-Buitrago J.M. & Velázquez E., (2011). MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. *Plos One*. 6, 220-223.

Foury A., (1954). Les légumineuses fourragères au Maroc. Rabat: Service de la recherche agronomique. 196 – 285.

Frank B., (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7, 332-346.

G

Bonnier G., Robert Douin R. & Poinot I.J., (1990). La Grande Flora en couleurs de Gaston Bonnier, (3). (Ed) Belin, p 252.

Gibson K.E., Kobayashi H. & Walker G.C., (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*. (42), 413-44.

Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M., Simon D., Cartieaux F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Manganot S., Sgurens B., Dossat C., Franck W.L., Chang W.S., Saunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich

D., Vermeiglio A., Medigue C., & Sadovsky M., (2007). Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*. *Science*. 316, 1307-1312.

Glenn A.R. & Dilworth M.J., (1994). The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letters*, 123, 1-9.

Gram C., (1884) Ueber die isolierte Färbung des Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte des Medicin*. 2, 185-189.

Graham P.H., Sadowsky M. J., Kersters H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W. & Young J.P., (1991). Proposed 40 minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*. 41(4), 582-587.

Graham P. H., (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 38, 457-484

Graham P. H., Draeger K., Ferrey M. L., Conroy M. J., Hammer B. E., Martinez E., Naarons S. R. & Quinto C., (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(3), 198-207

Guiraud J.P., (1998). *Microbiologie alimentaire*. (Ed) DUNOD. Paris, p 651.

H

Halbleib C. M., Zhang Y., & Ludden P. W., (2000). Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3493-3500.

Hopkins W.G., (2003) *Physiologies végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. (Ed) de boeck. 99-120.

Hopkins W.G., (2003). *Physiologie végétale*. 1^{er} édition. Edition de Boeck. Paris. p 514.

Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. & Young C.C., (2005). Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia*. 49 (6), 577-584.

I

Issolah R., (1991). Etude du comportement de populations spontanées de treize (13) espèces du genre *Trifolium* L. Thèse Doctorat. INA: 1-235.

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. *Journal of environmental Quality*. 24, 1199–1204.

Issolah R. & Beloued A., (2005). The fodder legumes in Algeria: distribution, endemism and utilization. In Proceedings of the International Conference on “Promoting community-driven conservation and sustainable use of dryland agro biodiversity”, ICARDA, Aleppo, Syria (18-21).

Issolah R. & Yahiaoui S., (2008). Phonological variation within several Algerian populations of Sulla (*Hedysarum coronarium L., Fabaceae*). 12th Meeting of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Mediterranean pastures and Fodder crops. Elvas (Portugal). 9-12 April 2008. *Options Méditerranéennes. Série A : Séminaires Méditerranéens*. 79, 385-388.

Issolah R., Bouazza L., Tahar A., Terki N., Dehiles I., Mansour B., Nagoudi T., (2015). Caractérisation écologique de l’habitat naturel du trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum L., Fabaceae*) dans le nord-est de l’Algérie. *Terre et Vie*. 70 (2), 182-193.

J

Jarvis B. D. W., Mc lean T. S., Robertson I. G. C. & Fanning G. R., (1977). Phonetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(2), 235-248.

Jordan D.C., (1984). Family III *.Rhizobiaceae* Conn 1938. In Bergey’s manual of systematic bacteriology Vol.1.R.Kreig and J. G Holt (Ed).The Williams et Wilkins Co.Baltimore, 234-254.

K

Kape R., Parniske M. & Werner D. (1991). Chemotaxis and *nod* Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoides. *Applied and Environmental Microbiology*.57.

Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M. (2010). How Many Peas in a Pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant and Cell Physiology*. 51 (9), 1381–1397.

L

Lafond J. & Pageau D., (2007). Effets nutritionnels et non nutritionnels associés à la présence de légumineuses sur les rendements en grains d'orge et les nitrates du sol. *Canadian Journal of Soil Science*, 87 (4), 445-454.

Lawson I.Y.D., Muramatsu K. & Nioh I., (1995). Effect of organic matter on the growth, nodulation and nitrogen fixation of soybean grown under acid and saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*. 41(4) ,721-728.

Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C. & Dénarié J., (1990). Symbiotic host specificity of *Rhizobium melilotis* determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344, 781-784.

Lin W., (2004). Les Puces à ADN sur lames de verre : principe et méthodes de confection, d'application expérimentale et d'analyse des données. Extraits du mémoire de la thèse de Doctorat : application de la technologie des Puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Institut Curie. France, p 60.

Longfei Z., Deng Z., Yang W., Cao Y., Wang E. & Wei G (2010). Diverse rhizobia associated with *Sophora alba* grown in different regions of Loess Plateau in China. *Systematic and applied microbiology*, 33(8), 468-477.

Louarn G., Faverjon L., Bijelić Z. & Julier B., (2016). Dynamique de l'azote dans les associations graminées-légumineuses: quels leviers pour valoriser l'azote fixé, Fourrages. (226), 135-142.

Lucinski R., Polcyn W. & Rotayczak L., (2002). Nitrate reduction and nitrogen in symbiotic *Acta Biochemical Polemica*. 49 (2), 537-546.

M

Madigan M. & Martinko J., (2007). *Brock Biologie des microorganismes*. 11ème Edition. (Ed): Pearson. France, 599-681.

Marchal N., Bourdon J.L. & Richard C.L., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. (Ed). Doin Editeurs. Paris. p 477.

Masterson C. L. & Sherwood M. T., (1970). White clover *Rhizobium* symbiosis: review. *Occasional Symposium British Grassland Society*. 6, 11-39.

Matthew C.J., Bjorkman M.K., David M.K., Saito A.M. & Zehr P.J., (2008). Regional distributions of nitrogen-fixing bacteria in the Pacific Ocean. *Limnol. Limnology and Oceanography*. 53, 63-77.

Mebarkia A. & Abdelguerfi A., (2006). Etude du potentiel agronomique de trois espèces de vesces (*Vicia spp.*) sous les conditions pluviométriques d'une région semi-aride de setif. Workshop international « Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes : Applications Biotechnologiques, Agronomique set Environnementales ». Alger. pp 19-22, 264-269.

Mobley, L.T.H. (1992) - Urease microbial. In J. Lederberg's Vol 4. Academic Press. Inc. (Ed). Encyclopedia of Microbiology. pp 327-346

Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C., (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of *Proteobacteria*. Nature. 411, 948-950.

N

Ndiaye A., (1996). Diversité et fixation d'azote des rhizobiums d'*Acacia*. Dakar, Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Cheikh Anta Diop, p 43.

O

Okazaki S.,Noisangiam R.R.,Okubo T., Kaneko T., Oshima K.,Hattori M., Teamtisong. K.,Songwattana.P.Tittabuter.P.Boonkerd.N. Saeki. K.Sato. S.Uchiumi.T. Minamisawa K.,Teaumroong N., (2015). Genome analysis of a novel Bradyrhizobium sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. PloS one. 10 (2), 0117392.

Ozenda P., (1991). Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris. 3^{ème} Edition, p 663.

P

Peret B., (2007). Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc UFR des sciences. France, p 78.

Peret B., (2007). Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat en physiologie végétale. Université Montpellier II .France. (p 70).

Perret X., Staehelin C. & Broughton W .J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64, 180–201.

Prin Y., Le Roux C., Galina A. & Duponnois R., (2017). Perdus de vue : réunir les partenaires symbiotiques des légumineuses cultivées. Innovation Agronomique. 60, 11-19.

Pujic P. & Normand P., (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes, 26-29.

Q

Quézel P. & Santa L., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed.CNRS, 505-514.

R

Rai R. Bantawa P, Sur S., (2014). Trends in biochemical and molecular characterization of rhizobia and their nitrogen fixation mechanism: A review. In:Sen Aeditor. Biology of Useful Plants and Microbes. New Delhi, India: Narosa Publishing House, 61-119.

Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E., (2007). Biologie végétale. (Ed): de boeck université. 2^{ème}Edition. Paris-France. 653-660.

Rees D.C., & Howard J.B., (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. Current opinion in chemical biology. 4 (5), 559-566.

Richter G., (1993). Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. (Ed). Presse polytechniques et universitaires. Romande, p 526.

Roger P.A., Dommergues Y., Balandreau J., Dreyfus B. & Sougoufara B., (1996) La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement, Conférence débat de L'ORSTOM. Paris Xe France

S

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

Saoudi M., (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Université Mentouri de Constantine. Constantine-Algérie, p 99.

Simon, T (2003) Utilization of biological nitrogen fixation for soil evolution. Plant soil Environ. 49 (8), 359-363.

Soltner D., (1988). Les bases de la production végétale : le sol, le climat, la plante-Tome 1 : le sol.16^{ème} édition. Collection Sciences et Techniques Agricoles. France, p 453.

Sneath P.H.A., Sokal R.R. & Freeman W.H., (1975) Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Systematic Zoology. 24 (2), 263-268.

Spaink H.P., (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Review of Microbiology.54, 257-288.

Stepkowski T., Banasiewicz J., Granada C.E., Andrews M. & Passaglia L. M. P., (2018). Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the *Tribe Genisteae*. *Gene*. (9), 163.

T

Terefework Z., (2002). Diversity and Phylogen of *Rhizobium* galegae, and reflections on molecular evolution of *Rhizobium*-legume symbiosis. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki.

Tison J. M. & de Foucault B., (2014). Flora gallica: Flore de France. Biotope Éditions, (Mèze), p 1196.

Tortora G.J., Funk B.R. & Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Montréal, p 968.

Tunrr NcroN, Roy eNoBunooN, J. J. (1983). The biology of Canadian weeds.54. *Trifolium repens* L. Canadian Journal of Plant Science. 63, 243-266.

V

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. & Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiological Review*. 60, 407-438.

Vincent J.M., (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

Voisin A.S. & Gestalt F., (2015). Les spécificités de leur fonctionnement agro-physiologique. In colloque« Les légumineuses, pour des systèmes agricoles et alimentaire durable». Présentation de l'ouvrage" Nutrition azotée et fonctionnement agro physiologique spécifique des légumineuses", Schneider A., Huyghe C., eds. Editions Quae.(p.np).

Voisey C.R., White D.W., Wigley P.J., Chilcott C.N., Mc Gregor P.G. & Woodfield D.R., (1994). Release of transgenic of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes: An ecological perspective. *Biocontrol Science and Technology*. 4,475-481.

W

Waligora C. & Tetu T., (2008). Légumineuses il est urgent de les réhabiliter. (Ed) Techniques culturales simplifiées. p 48.

Williams W., (1970). White clover in British Agriculture. Occasional Symposium British Grassland Society. 6, 1-10.

X

Xi C., Schoeters E., Vanderleden J., & Michiels J., (2000). Symbiosis-specific expression of *Rhizobium etli* *casA* encoding a secreted calmodulin-related protein. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America. 97 (20), 11114-11119.

Y

Yann P., (2006). Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium* légumineuses. Master Recherche. Microorganisme du génome aux interactions avec l'hôte. Université de Paul Sabatier. Toulouse III.

Z

Zakhia F., & de Lajudie P., (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, 21(6-7), 569-576.

Zakhia F. & de Lajudie P., (2006). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian journal of microbiology*, 52 (3), 169-181.

Zahran H. H., (1999): *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4) 968-989.

Zimri-Zembri N., & Kadi S. A., (2016). Valeur nutritive des principales ressources fourragères utilisées en Algérie. Les fourrages natural's herbacés. *Livestock Research for Rural Development*. 28 (8), 1-16.

Référence électronique

(<http://www.tela-botanic.org>)

Annexes

Annexe I

Composition des milieux de cultures

(Pour 1 litre), (Vincent, 1970)

A-Milieux de cultures utilisées pour la croissance des Rhizobia (YMA et YMB)

➤ Milieu YMA (yeast Mannitol Agar)

Mannitol	10 g
Extrait de levure.....	0.4 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O.....	0.5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2 g
NaCl.....	0.1 g
Agar	15 g

Ajusté à pH 6, 8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

➤ Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol	110 g
Extrait de levure.....	0.4 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O.....	0.5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2 g
NaCl.....	0.1 g

Ajusté à pH 6. 8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Milieu M1

Glucose	20g
Extrait de levure.....	10g
Carbonate de calcium.....	20g
Agar.....	18g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser 120°C pendant 20 minutes

Milieu M2

Lactose	10g
Extrait de levure	01g
Agar.....	18g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser 120°C pendant 20 minutes

B-Milieu de culture utilisée pour les plants**➤ Composition de Milieu Jensen**

Solution stocke Dix fois concentrée (10X)	100ml
Oligo-éléments	1ml
FeCl ₂	300µl

Ajusté à pH 7

C /Composition de réactif**➤ Réactif de Benedict**

Citrate de sodium.....	173g
Carbonate de sodium anhydre	100g
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	7.3 g

D /Milieu utilisés pour la caractérisation biochimique :

- **Bouillon nitraté, Bouillon Clark et Lubs, Citrate de Simmons, Exempte d'indole, TSI** : Prête à l'emploi. Acheté à partir de l'institut Pasteur.

➤ Préparation de l'eau physiologique

NaCl	19g
Eau distillée.....	1000ml

Ajusté à pH 7,0

Stérilisation à 120°C pendant 20min

Annexe II

Protocole de la coloration de Gram

1. Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre.
2. Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
3. Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes.
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
5. Couvrir de Lugol pendant 3 secondes.
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
7. Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool- acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
9. Couvrir avec de la fuchsine(ou safranine) pendant 60 secondes.
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant.
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope au grossissement (G : X100).

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres

Annexe III

Résultats des tests physiologiques

Tableau AI: Résultats de l'effet du pH sur la croissance des bactéries isolées de *T.repens* et *T.campestre* (DO_{600nm})

Souches	pH 4	pH 6	ph 8
Tr1-1	0,023	0,327	0,467
Tr2-2	0,010	0,558	0,398
Tr3-3	0,011	0,374	0,329
Tr4-4	0,012	0,307	0,400
Tr5-5	0,013	0,261	0,319
Tr7-7	0,012	0,305	0,338
Tr8-8	0,020	0,330	0,312
Tr1 ^{s1}	0,009	0,333	0,363
Tr2	0,010	0,388	0,358
Tr3	0,011	0,345	0,255
Tr4	0,016	0,355	0,345
Tr5	0,013	0,378	0,434
Tr6	0,014	0,378	0,405
Tr7	0,012	0,381	0,284
Tr8	0,012	0,307	0,139
Tr9	0,010	0,405	0,525
Tr10	0,023	0,394	0,452
Tr11	0,021	0,322	0,383
Tr12	0,018	0,265	0,233
Tr13	0,016	0,455	0,325
Tc1	0,030	0,351	0,348
Tc2	0,022	0,349	0,341
Tc3	0,011	0,363	0,342
Tc4	0,024	0,301	0,375
Tc5	0,024	0,232	0,434
Tc1 ⁰⁴	0,022	0,380	0,406
Tr2 ⁰³	0,015	0,298	0,149
LcT1	0,02	0,288	0,146

Tableau AII : Résultats de l'effet de la température sur la croissance des bactéries isolées de *T.repene* et *T.campestre* (DO_{600nm})

Souches	26°C	28°C	30°C	37°C
Tr1-1	0,019	0,456	0,125	0,017
Tr2-2	0,018	0,278	0,125	0,037
Tr3-3	0,072	0,185	0,192	0,259
Tr4-4	0,066	0,270	0,120	0,035
Tr5-5	0,015	0,107	0,122	0,040
Tr7-7	0,012	0,111	0,117	0,017
Tr8-8	0,008	0,252	0,132	0,046
Tr1 ^{sl}	0,193	0,143	0,291	0,064
Tr2	0,345	0,281	0,350	0,217
Tr3	0,165	0,245	0,245	0,042
Tr4	0,159	0,280	0,338	0,151
Tr5	0,214	0,292	0,314	0,169
Tr6	0,189	0,334	0,284	0,373
Tr7	0,409	0,371	0,318	0,298
Tr8	0,350	0,339	0,283	0,234
Tr9	0,396	0,516	0,454	0,232
Tr10	0,327	0,391	0,345	0,390
Tr11	0,251	0,328	0,273	0,214
Tr12	0,127	0,249	0,258	0,200
Tr13	0,190	0,270	0,263	0,230
Tc1	0,075	0,238	0,133	0,057
Tc2	0,235	0,379	0,350	0,206
Tc3	0,065	0,163	0,147	0,029
Tc4	0,052	0,112	0,124	0,094
Tc5	0,084	0,118	0,124	0,061
Tc1 ⁰⁴	0,207	0,297	0,309	0,322
Tr2 ⁰³	0,169	0,281	0,242	0,054
Tr2 ⁰³	0,169	0,281	0,242	0,054
LcT1	0,400	0,572	0,570	0,096

Tableau AIII: Résultats de l'effet du NaCl sur la croissance des bactéries isolées de *T.repens* et *T.campestre* (DO_{600nm})

Souches	1%	2%	3%	4%
Tr1-1	0,013	0,011	0,010	0,005
Tr2-2	0,016	0,004	0,014	0,006
Tr3-3	0,004	0,006	0,017	0,015
Tr4-4	0,006	0,020	0,006	0,009
Tr5-5	0,010	0,013	0,013	0,006
Tr7-7	0,003	0,021	0,017	0,016
Tr8-8	0,005	0,006	0,006	0,010
Tr1 ^{s1}	0,004	0,003	0,006	0,011
Tr2	0,005	0,007	0,020	0,007
Tr3	0,006	0,015	0,007	0,011
Tr4	0,009	0,007	0,006	0,018
Tr5	0,035	0,014	0,064	0,069
Tr6	0,005	0,005	0,009	0,011
Tr7	0,008	0,011	0,010	0,025
Tr8	0,007	0,009	0,014	0,007
Tr9	0,004	0,005	0,024	0,004
Tr10	0,008	0,004	0,011	0,008
Tr11	0,010	0,013	0,009	0,009
Tr12	0,198	0,130	0,071	0,031
Tr13	0,014	0,004	0,010	0,004
Tc1	0,025	0,009	0,006	0,012
Tc2	0,008	0,002	0,029	0,014
Tc3	0,038	0,007	0,004	0,007
Tc4	0,009	0,009	0,013	0,011
Tc5	0,004	0,013	0,006	0,014
Tc1 ⁰⁴	0,015	0,009	0,014	0,045
Tr2 ⁰³	0,006	0,016	0,005	0,018
LcT1	0,095	0,069	0,036	0,020

Résumé

Vingt-sept isolats bactériennes ont été isolés à partir des nodules racinaires de *Trifolium repens* et *T. campestre*, légumineuses fourragères collectées à partir de deux sites situés à Bejaïa et ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypiques.

Les résultats obtenus de la caractérisation physiologique montrent que toutes les bactéries isolées présentent une bonne croissance à pH 6 et entre 28°C et 30°C, la plupart des isolats ne résistent pas à de fortes concentrations NaCl. Les tests biochimiques montrent une diversité de réponse concernant les tests effectués traduisant un bon bagage enzymatique. L'authentification des isolats à travers un test de nodulation est aussi effectuée, les résultats positifs confirment l'appartenance des isolats étudiés aux rhizobia.

Mots clés : *Trifolium repens*, *T. campestre*, rhizobia, caractérisation, phénotype.

Abstract

Twenty-seven bacterial isolates were isolated from root nodules of *Trifolium repens* and *T. campestre*, forage legumes collected from two sites in Bejaïa and underwent phenotypic characterization.

The results obtained from the physiological characterization showed that all the isolated strains have good growth at pH 6 and between 28 ° C and 30 ° C; most isolates are not resistant to high NaCl concentrations. The biochemical tests revealed a diversity of response concerning the tests carried out reflecting a good enzymatic background. Isolates authentication through a nodulation test was also performed, the positive results confirm that the isolates studied belong to rhizobia.

Key words: *Trifolium repens*, *Trifolium campestre*, rhizobia, characterization and phenotype.