



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté des sciences de la nature et de la vie, de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE »

## Mémoire

Présenté par :

Derouiche Djaouida & Daoud Asma

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie et Contrôle de qualité

## Thème

**Caractérisation de souches de *Rhizobium* et sensibilité aux antibiotiques**

Soutenu publiquement le 23/06/2024

Devant le jury :

<b>Président</b>	Pr. Rebiahi Sidahmed	Université de Tlemcen
<b>Encadrante</b>	Dr. Rahmoun Malika	Université de Tlemcen
<b>Examinatrice</b>	Dr. Meziani Zahira	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2023/2024

## **Remerciements**

On remercie,

Allah le tout puissant, le clément le très miséricordieux de nous avoir aidé tout au long de nos années d'étude et de nous avoir donné la patience et le courage pour arriver ce stade.

**Notre encadrante,**

**Dr Malika Rahmoun**

Tous les mots ne seront suffisants pour exprimer nos profondes reconnaissances et nos chaleureux remerciements à notre promotrice nous sommes très reconnaissants pour votre gentillesse et votre soutien moral, et votre complicité.

Que ce travail porte son fruit et vous soit l'expression de notre gratitude et notre profond respect.

Qu'il vous soit dédié...

**A notre juge et président de Mémoire**

**Pr Sid Ahmed Rebiahi**

Nous souhaitons vous remercier d'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire, Nous avons été touchés par la bienveillance et la gentillesse que vous nous avez accordées. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Ce travail est l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

**A notre jury de mémoire**

**Dr Zahira Meziani**

Vous nous faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de siéger parmi notre jury de mémoire et d'évaluer notre travail.

Veuillez trouver ici l'expression de notre estime et notre grand respect

## Dédicace

Du profond de mon cœur, Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection

A la lumière de mon cœur et l'éclairage de mes yeux, à la source de la tendresse et raison de tout succès dans ma vie à ma mère « Fatima » que dieu la garde inshallah

A la personne qu'il me pousse vers l'avant et qu'il me donne l'espoir à vous mon père

« Abdellah » tu représentes pour moi le symbole du sacrifice et la patience

A mes très chères sœurs « Amina, Hayet, Meriem, Faiza et Amira » source d'espoir et de motivation, qui m'ont soutenu et m'ont encouragé, je vous aime de tout mon cœur.

A mes adorables neveux et nièces, que Dieu les protège.

A mes chères tantes, que dieu les protège et les accorde une bonne santé et une vie heureuse

A toute ma famille

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mon binôme « Asma » avec qui j'ai passé l'une des meilleures années durant mon cursus universitaire, et j'ai partagé des moments de stress et de folie. Je te remercie infiniment pour tes aides et support dans les moments difficiles

A mes plus proches amies « Amel, Amira et Fatima » source de joie et de bonheur, merci pour votre sincère amitié, le soutien et l'amour que vous m'avez offert, je vous aime  
beaucoup

A mes chères amies « Meriem Benbekhti, Hanane, Meriem, Chourouk et Khadidja », je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur et de réussite

Enfin je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin.

# Djaouida

## Dédicace

C'est à vous que je dédie ces mots :

En ce moment important de ma vie, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre soutien inconditionnel votre amour indéfectible et vos sacrifices constants. Cette mémoire de fin d'étude est le fruit de vos encouragements de vos conseils avisés et de votre exemple inspirant. Que ce modeste témoignage de ma reconnaissance vous parvienne comme une humble expression de mon amour et de mon respect éternel.

À mon père « Ahmed »,

A travers chaque page de ce travail, je porte avec fierté votre héritage et je dédie cette réussite à votre amour inépuisable. Votre présence bienveillante a été ma force tout au long de ce parcours, et je vous en suis infiniment reconnaissant.

À ma mère « que Dieu ait son âme »,

La main invisible qui a enlevé les épines de mon chemin, et qui a supporté chaque moment de douleur que j'ai traversé, m'a soutenu et a veillé tard dans la nuit pour mon bien-être, et s'est réveillée tôt pour prier pour moi.

A mes très chers frères et sœur,

Avec affection, « KHALED » « NADJIA »

A ceux qui m'ont soutenu avec amour dans mes moments de faiblesse et qui ont écarté tous les obstacles de mon chemin, préparant ainsi la voie pour moi, plantant la confiance et la détermination en moi, mon appui et l'épaule sur laquelle je me suis toujours appuyé(e). Que cette réussite soit également la vôtre, car chacun de vous a contribué à ma croissance et à mon épanouissement. Ensemble, nous avons partagé des moments de joie, surmonté des défis et célébré des victoires. Je vous dédie ce succès avec tout mon amour et ma reconnaissance. Que notre lien fraternel continue à nous unir dans les succès à venir.

A mon adorable petite sœur « Chaïma » qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A ma chère amie sœur « Djaouida », Celle qui m'a toujours soutenu et a été mon roc dans toutes les difficultés, celle que Dieu m'a donnée pour connaître le goût de la vie à travers elle.

Merci d'avoir été une source d'inspiration et de bonheur, ce diplôme n'est pas seulement le mien, mais aussi le tien, car tu as été une part importante de ce voyage. Je suis reconnaissante de t'avoir à mes côtés.

A mes très chers amis : Hanane, Meriem, Meriem Benbekhti...Je vous souhaite à tous le bonheur et le succès dans vos vies.

A toute la famille DAOUD

A toute la famille BOUCHAOUR

A toute les membres de la promo du master 2 microbiologie et contrôle de qualité

**DAOUD ASMA**

# Résumé

---

## Résumé

Les *Rhizobia* sont des bactéries symbiotiques fixant l'azote dans les nodules racinaires des légumineuses principalement, elles sont souvent cultivées dans des régions arides et semi-arides.

Cette étude a porté sur la caractérisation phénotypique et culturale de quatorze souches de *Rhizobia* associées à *Vicia faba*. L qui ont été collectées et isolées de différentes régions de la wilaya de Tlemcen. La sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose.

Les résultats ont montré que ces bactéries constituaient un groupe distinct à la fois des *Rhizobia* à croissance rapide et d'autres à croissance lente. En ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques, certaines souches de *Rhizobium* ont présenté une forte sensibilité vis-à-vis de certains antibiotiques tandis que d'autres peuvent être résistantes en raison de leur diversité génétique.

**Les mots clés :** *Rhizobium, légumineuses, symbiose, fève, fixation d'azote, sensibilité aux antibiotiques.*

# Résumé

---

## Summary

*Rhizobia* are symbiotic nitrogen-fixing bacteria in the root nodules of legumes mainly, they are often grown in arid and semi-arid regions.

This study focused on the phenotypic and cultural characterization of fourteen *Rhizobia* strains associated with *Vicia faba*. I which have been collected and isolated from different regions of Tlemcen wilaya. Antibiotic sensitivity was achieved by the agar diffusion method.

The results showed that these bacteria constituted a distinct group of both fast-growing and slow-growing *Rhizobia*. In terms of antibiotic susceptibility, some strains of *Rhizobium* have shown high susceptibility to certain antibiotics while others may be resistant due to their genetic diversity.

**Keywords:** *Rhizobium*, *legumes*, *symbiosis*, *faba bean*, *nitrogen fixation*, *antibiotic sensitivity*.

## Résumé

---

### ملخص:

الريزوبيا هي بكتيريا تكافلية تثبت النيتروجين في العقيدات الجذرية للبقوليات بشكل أساسي، وغالبًا ما تزرع في المناطق القاحلة وشبه القاحلة.

ركزت هذه الدراسة على التوصيف الظاهري والزراعي لسلاسل ريزوبيا اربعة عشر المرتبطة بفيصيا فابا التي تم جمعها وعزلها من مناطق مختلفة من ولاية تلمسان. تم تحقيق حساسية المضادات الحيوية من خلال طريقة انتشار أجار.

أظهرت النتائج أن هذه البكتيريا شكلت مجموعة مميزة من ريزوبيا سريعة النمو وبطيئة النمو. من حيث قابلية المضادات الحيوية، أظهرت بعض سلالات الريزوبيوم قابلية عالية للإصابة بمضادات حيوية معينة بينما قد تكون أخرى مقاومة بسبب تنوعها الجيني.

**الكلمات الرئيسية:** الريزوبيوم، البقوليات، التعايش، الفول، تثبيت النيتروجين، حساسية المضادات الحيوية.



# Table des matières

---

## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

**Chapitre 1 : Symbiose *Rhizobium*-Légumineuses ..... 4**

1. *Rhizobium*..... 4

1.1. Historique et généralité de *Rhizobium*..... 4

1.2. Caractères généraux de *Rhizobium*..... 5

1.2.1. Caractères morphologiques ..... 5

1.2.2. Caractères biochimiques..... 6

1.2.3. Caractères culturaux..... 6

1.3. Taxonomie de *Rhizobium*..... 7

2. Les légumineuses ..... 9

2.1. Classification des légumineuses ..... 9

2.2. Morphologie des légumineuses ..... 9

2.3. La plante légumineuse *Vicia faba*. L..... 10

**Chapitre II : Fixation biologique de l'azote et symbiose *Rhizobium*-légumineuses ..... 12**

1. Cycle de l'azote..... 12

1.1. Fixation de l'azote ..... 13

1.2. Ammonification..... 13

1.3. Nitrification ..... 13

1.4. Dénitrification ..... 13

2. La symbiose fixatrice d'azote ..... 13

3. Nodulation ..... 14

3.1. Processus de formation des nodules ..... 14

3.1.1. Pré-infection ..... 15

3.1.2. Infection ..... 15

3.1.3. Organogenèse des nodules ..... 16

3.2. Types de nodules ..... 17

3.3. Les facteurs Nod..... 18

**Chapitre III : Les antibiotiques..... 20**

1. Définition des antibiotiques ..... 20

## Table des matières

---

2. Classification des antibiotiques.....	20
3. Modes d'action des antibiotiques.....	21
4. Résistance des Rhizobia aux antibiotiques .....	23
4.1. Mécanismes de résistance des <i>Rhizobia</i> aux antibiotiques .....	23
<b>Chapitre IV : Matériel et Méthodes .....</b>	<b>27</b>
1. Isolement des bactéries nodulant la fève ( <i>Vicia faba</i> L.).....	27
1.1. Description de la zone d'étude .....	27
1.2. Collecte des nodules .....	28
1.3. Conservation des nodules.....	29
1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules .....	30
1.4.1. Stérilisation des nodules.....	30
1.4.2. Ecrasement des nodules et ensemencement .....	30
2. Caractères morphologiques et culturaux de <i>Rhizobium</i> .....	31
2.1. Principaux milieux utilisés.....	31
2.2. Purification des isolats .....	31
2.3. Examen de la mobilité à l'état frais .....	32
2.4. Examen microscopique après coloration de Gram .....	32
2.5. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) .....	32
2.6. Croissance sur YMA contenant du bleu de bromothymol (BTB) .....	32
2.7. Croissance sur milieu Glucose-Peptone-Agar (GPA).....	32
3. Caractères biochimiques.....	33
3.1. Test de la catalase .....	33
3.2. Test de l'oxydase.....	33
3.3. Test du citrate de Simmons .....	33
3.4. Test du nitrate réductase .....	33
4. Conservation des isolats .....	34
5. Sensibilité aux antibiotiques .....	34
<b>Chapitre V : Résultats et Discussion .....</b>	<b>37</b>
1. Isolement des souches .....	37
2. Etudes phénotypiques des bactéries isolées à partir des nodules de la plante légumineuse <i>Vicia faba</i> L.....	38
2.1. Caractères culturaux .....	38
2.1.1. Croissance sur le milieu YMB.....	38
2.1.2. Croissance sur le milieu YMA.....	38

## Table des matières

---

2.1.3.	Croissance sur le milieu YMA-RC .....	39
2.1.4.	Croissance sur milieu YMA contenant du bleu de Bromothymol .....	39
2.1.5.	Croissance sur milieu GPA+BCP .....	40
2.1.6.	Examen microscopique .....	41
3.	Caractères biochimiques.....	42
3.1.	Test de la catalase .....	42
3.2.	Test d'oxydase.....	42
3.3.	Test du citrate de Simmons .....	43
3.4.	Test du nitrate réductase .....	43
4.	Sensibilité aux antibiotiques .....	45
<b>Conclusion et perspectives .....</b>		<b>49</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>51</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>64</b>

## Liste des abréviations

---

### Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADP** : Acide adénosine diphosphate

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Acide adénosine triphosphorique

**BCP** : Poudre de Bromocrésol

**BNL** : Bactéries nodulant les légumineuses

**BTB** : Bleu de Bromothymol

**C°** : Degré Celsius

**e<sup>-</sup>** : Électron

**FeMo** : Protéine Fer-Molybdène.

**FN** : Facteur Nod

**FT** : Facteurs de Transcription

**GlcNAc** : N-acétyl-D-glucosamine

**GPA** : Glucose Peptone Agar

**H** : Heure

**H<sup>+</sup>** : Cation hydrogène

**H<sub>2</sub>** : Dihydrogène

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**L.** : Abréviation botanique standard de Carl von Linné.

**LCO**: Lipochitinoooligosaccharides

**LPWG**: The legume Phylogeny Working Group

## Liste des abréviations

---

**MAE** : Ministère des Affaires étrangères

**N** : Azote

**N<sub>2</sub>** : Diazote

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Nitrite

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** : Ammonium

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Nitrate

**Nod** : Produit du gène de nodulation (facteur Nod).

**NodD** : Protéine régulatrice

**PH** : potentiel hydrogène

**RC** : Rouge Congo

**RND** : résistance-nodulation-division cellulaire

**s.d.** : sans date

**v/v** : volume/volume

***V. faba*** : la plante *Vicia faba*

**VSSC** : la voie de signalisation symbiotique commune

**YEM**: Yeast Extrat Mannitol

**YMA**: Yeast Mannitol Agar

**YMB**: Yeast Mannitol Broth

## Liste des Figures

---

### Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Racine de fenugrec montrant un nodule développé par une bactérie Symbiotique, <i>Rhizobium</i> .....	4
<b>Figure 2</b> : Morphologie de <i>Rhizobium trifolii</i> . .....	5
<b>Figure 3</b> : Bactéries du genre <i>Rhizobium</i> vues au microscope électronique à balayage (G X 1000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire. ....	6
<b>Figure 4</b> : Les fleurs et les fruits de <i>Vicia faba</i> . L. ....	11
<b>Figure 5</b> : Cycle de l'azote .....	12
<b>Figure 6</b> : Les nodules chez légumineuses. ....	14
<b>Figure 7</b> : Formation des nodules fixateurs d'azote. ....	17
<b>Figure 8</b> : Structure des nodules de légumineuses. ....	18
<b>Figure 9</b> : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques. ....	25
<b>Figure 10</b> : Localisation géographique de la zone prélèvement. ....	28
<b>Figure 11</b> : Collecte des nodules. ....	28
<b>Figure 12</b> : Plante extraite avec son appareil racinaire .....	29
<b>Figure 13</b> : Nodules conservé sous 4°C. ....	30
<b>Figure 14</b> : L'écrasement des nodules. ....	31
<b>Figure 15</b> : Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse de différentes régions. ....	37
<b>Figure 16</b> : Croissance de la souche P2.3C sur le milieu YMA. ....	38
<b>Figure 17</b> : Croissance sur le milieu YMA+RC. ....	39
<b>Figure 18</b> : Croissance de souches sur milieu YMA additionné du bleu de Bromothymol .....	40

## Liste des Figures

---

<b>Figure 19</b> : Aspect macroscopique de la croissance de la souche P2.1 sur GPA+BCP. ....	41
<b>Figure 20</b> : Observation microscopique de souches après coloration de Gram (G X 40).. .....	41
<b>Figure 21</b> : Observation microscopique des souches au microscope électronique à balayage (Grossissement X 10000) .....	42
<b>Figure 22</b> : Résultat du test de catalase.....	42
<b>Figure 23</b> : Résultat du test d'oxydase.....	43
<b>Figure 24</b> : Résultat du test de la Nitrate-réductase. ....	44
<b>Figure 25</b> : Résultat de l'antibiogramme de la souche P2.1.....	46
<b>Figure 26</b> : Résultats de la sensibilité des isolats aux différents antibiotiques. ....	47

## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification simplifiée des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des Légumineuses.....	8
<b>Tableau 2</b> : Les principales classes d'antibiotiques.....	20
<b>Tableau 3</b> : Mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques.....	22
<b>Tableau 4</b> : Les coordonnées géographiques de Bordj Arima, Remchi, Boukiou.....	27
<b>Tableau 5</b> : Différents antibiotiques testés.....	35
<b>Tableau 6</b> : Nombre de souches isolées dans les trois régions. ....	37
<b>Tableau 7</b> : Résultats des tests biochimiques.....	44
<b>Tableau 8</b> : Résultats de l'antibiogramme pour les souches testées. ....	45



# **Introduction**

# Introduction

---

## Introduction

Le sol sert de support pour divers cycles d'échanges d'énergies et de transfert de substances entre les organismes qui y vivent, avec le cycle de l'azote étant l'un des plus importants (Marot-Gaudry, 1997). Dans le processus symbiotique, les microorganismes transforment l'azote atmosphérique en ammoniac grâce à l'enzyme nitrogénase, fournissant ainsi un nutriment essentiel à la plante hôte. Le genre *Rhizobium* est particulièrement connu pour son association avec les légumineuses, permettant la fixation de l'azote atmosphérique (Rajasundari, 2009).

Bien que les biologistes aient souvent des avis divergents sur la définition du terme symbiose, on peut la décrire comme une association étroite et mutuellement bénéfique entre deux organismes distincts, chacun influençant le métabolisme de l'autre. Parmi toutes les formes de symbiose, l'association entre *Rhizobium* et les légumineuses, reconnue pour sa spécificité et sa permanence, est indéniablement la plus connue et la plus étudiée (Meijer et Broughton, 1982).

L'étude des *Rhizobia* qui forment des nodules sur les légumineuses est l'un des domaines de recherche les plus prolifiques en microbiologie, en raison de l'impact agronomique et écologique significatif de ces bactéries grâce à leurs propriétés symbiotiques avec les légumineuses (Djoudie et *al.*, 2021), en tant que ressource biologique précieuse dans la recherche des souches bactériennes présentant des caractéristiques intéressantes pour maximiser la productivité agricole. En effet, le *Rhizobium* est une bactérie du sol, qui forme des nodules et établit une symbiose avec les légumineuses, réduisant ainsi l'azote atmosphérique sous une forme pouvant être absorbée par les plantes. Cette capacité réduit l'utilisation d'engrais chimiques dans l'agriculture, répondant à environ 90% des besoins en azote des plantes et enrichissant le sol pour les cultures ultérieures. Au total, cette symbiose présente de nombreux avantages parmi lesquels le maintien et la restauration de la fertilité des sols (Dai et Wang, 2012). De telles études nous permettent non seulement de trouver de nouvelles souches de rhizobium, mais elles soutiennent également les efforts de recherche visant à sélectionner les meilleures combinaisons de *Rhizobium* et de légumineuses. Au cours des vingt dernières années, la diversité et la taxonomie de ces microorganismes ont été largement explorées en raison de leur importance écologique et économique (Weir, 2006).

## Introduction

---

Cependant, il est essentiel de comprendre les caractéristiques de ces souches de *Rhizobium*, notamment leur sensibilité aux antibiotiques. Cette sensibilité peut avoir un impact significatif sur l'efficacité de la symbiose et sur la santé des plantes.

L'objectif de ce travail a été l'isolement et la caractérisation de souches de *Rhizobium* nodulant la plante *Vicia faba*. L, ainsi que l'étude de la sensibilité aux différents antibiotiques.

Ce contexte a été structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui vise les principales informations sur la symbiose des plantes légumineuses « la fève » avec les micro-organismes (*Rhizobium*).

Le deuxième chapitre a été consacré à la partie « matériel et méthodes ».

Le troisième chapitre a été consacré à la présentation des résultats obtenus, les interprétations et les discussions.

**ETUDE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre 1 : Symbiose *Rhizobium*-Légumineuses1. *Rhizobium*1.1. Historique et généralité de *Rhizobium*

Les *Rhizobia* furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote à la remonte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. L'année suivante, par un autre microbiologiste cette bactérie est appelée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Pour utiliser commercialement la culture de *Rhizobium* dans l'agriculture, elle a été utilisée comme bio-fertilisant sous le nom de Nitragin et a été brevetée par Nobbe et Hiltner (1896) (Jnan et al., 2021).

Le terme *Rhizobium* vient du grec rhiza qui signifie « racine » et bio « vie », c'est un terme fonctionnel désignant les bactéries capables de former des nodosités avec des légumineuses (Benoit, 2019), ce sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Ces bactéries sont capables de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses (Benahmed, 2010). Ainsi, les *Rhizobia* sont utilisés comme engrais et en tant qu'inoculant dans l'agriculture depuis plus d'un siècle biologique (Odile, 2017).

Les *Rhizobia* sont des bactéries à gram négatif, en forme de tige, ils sont chémoorganotrophes, poussent bien en présence d'oxygène (aérobies) et utilisent des glucides et des acides aminés relativement simples. Ils sont capables d'établir un système de symbiose efficace de fixation de l'azote avec les légumineuses, dans la structure spécialisée appelée nodules racinaires (figure 1). Dans le processus symbiotique, ils réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant l'enzyme nitrogénase et fournissent ce nutriment essentiel à la plante hôte (Rajasundari, 2009).



**Figure 1 :** Racine de fenugrec montrant un nodule développé par une bactérie symbiotique, *Rhizobium* (Baljinder et al., 2008).

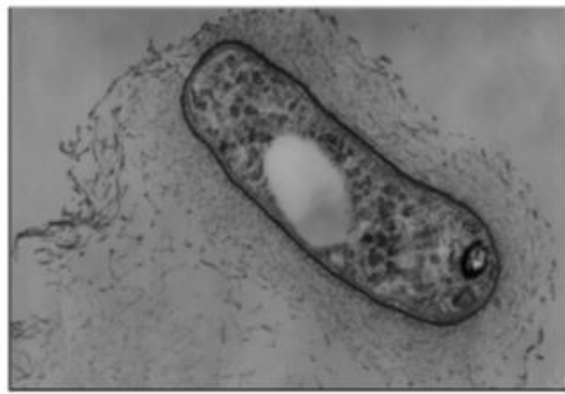
**1.2. Caractères généraux de *Rhizobium***

Les caractères généraux du *Rhizobium* comprennent sa capacité à vivre en symbiose avec les plantes, à fixer l'azote atmosphérique, à décomposer la matière organique du sol, et à améliorer la structure du sol (Académie des biostimulants, 2019).

**1.2.1. Caractères morphologiques**

Les *Rhizobia* ont été caractérisées comme des bactéries de forme bâtonnet, qui se caractérisent par leur nature à Gram-négatif, leur besoin d'oxygène, leur mode de nutrition hétérotrophe, et l'absence de sporulation (figure 2) (Kaddour et *al.*, 2010). Ils ont une taille qui s'étend de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$  de largeur et de 1,2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur. Ces bactéries sont mobiles grâce à la présence d'un flagelle polaire ou subpolaire, ou possèdent de 2 à 6 flagelles péritriches (Somasegaram et Hoben, 1994). On distingue deux formes de bactérie :

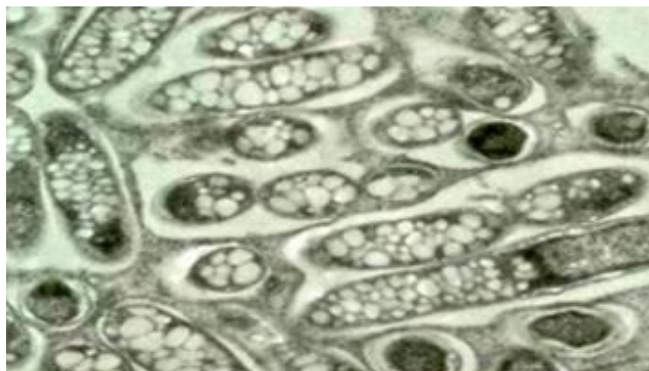
- Une forme végétative (figure 2) : des petits organismes communs dans le sol près des racines des plantes, et/ou dans les zones d'infection, très actifs lorsqu'ils sont jeunes et mobiles (Torche, 2006).



**Figure 2 :** Morphologie de *rhizobium trifolii*

(<https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinares.html>)

- Une forme bactéroïde (figure 3) : dans les racines des plantes, les *Rhizobia* subissent une transformation en bactéroïde, prenant des formes variées telles que branchées, sphériques ou en massue, à l'intérieur des cellules du vortex racinaire certains bactéroïde sont réguliers tandis que d'autres, comme chez les groupes *Rhizobium trifolii* sont irrégulier (Bouzraib et Bouzaine, 2016).



**Figure 3 :** Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope électronique à balayage (x 1 000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.

(<https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/5404/bacteroide>)

### 1.2.2. Caractères biochimiques

Les *Rhizobia* étant des bactéries hétérotrophes, se nourrissent de glucides simples tels que le glucose, le saccharose, le mannitol, ainsi que de composés aminés. A l'exception de quelques souches, il n'est pas habituel que les *Rhizobia* fixent l'azote sous forme libre, sauf dans des conditions particulières. Certaines souches de *Rhizobium* ont besoin de vitamines pour leur croissance (Somasegaran et Hoben, 1994).

La vitesse de croissance varie généralement d'une souche à l'autre chez les *Rhizobia*. Certaines se développent rapidement tandis que d'autres ont une croissance plus lente (Abda et *al.*, 2010). Leur croissance optimale se produit généralement à une température comprise entre 25 à 30 C°, avec un pH idéal situé entre 6 et 7 (Garrity, 2005).

### 1.2.3. Caractères cultureux

L'examen macroscopique révèle diverses caractéristiques des colonies qui se sont développées sur le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA) solide.

Ces colonies présentent généralement des teintes blanches ou beiges, avec une forme circulaire, mucilagineuse, semi-translucide ou opaque (Garrity, 2005). Les colonies jaunes pales sont généralement observées principalement dans les cultures plus âgées (Rouabhi et *al.*, 2018).

Les *Rhizobia* à croissance rapide (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* et les souches *Allorhizobium*) forment des colonies gommeuses de 4 à 6 mm après 3 à 7 jours sur milieu YEM. Ils induisent une turbidité en 2 à 3 jours avec un dédoublement toutes les 2 à 4h. En revanche, les souches de *Bradyrhizobium* ont une croissance plus lente, produisant des colonies de 1 à 2 mm après 7 à 10 jours, avec une turbidité en 3 à 5 jours et un dédoublement de 6 à 8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

### **1.3. Taxonomie de *Rhizobium***

Les *Rhizobia* établissent une symbiose avec les plantes de la famille des légumineuses, telles que les pois, les haricots et la luzerne. En cas de carence en azote, les *Rhizobia* induisent la formation de nodules sur les racines des légumineuses. Ces nodules servent d'organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes, offrant aux bactéries un habitat microbien favorable et leur permettant de bénéficier de substrats carbonés produits par la photosynthèse des plantes hôtes. Selon la classification de divers auteurs, la famille des *Rhizobiaceae* comprend différents genres (Sobti, 2013).

La plupart de ces espèces bactériennes font partie de la famille des *Rhizobiaceae*, qui sont des  $\alpha$ -protéobactéries, et appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* ou *Bradyrhizobium* (Mahboub, 2018).

Lorsqu'il a été reconnu que le spectre hôte n'était pas le seul critère à prendre en compte pour la classification des *Rhizobia*, les espèces ont d'abord été réorganisées en deux genres. Le genre révisé *Rhizobium* regroupe les souches à croissance rapide, tandis qu'un nouveau genre, *Bradyrhizobium*, a été créé pour les cultures à croissance lente. Depuis lors, l'isolement de *Rhizobia* provenant d'un nombre croissant d'espèces végétales à travers le monde et leur caractérisation par une taxonomie polyphasique ont conduit à la description de nouveaux genres et espèces (tableau 1) (Frédéric et Philippe, 2020).

Zakhia et *al.*, (2004) ont suggéré le terme BNL (Bacteria Nodulating Legumes) afin d'éviter toute confusion entre le terme plus général de *Rhizobium* et les noms de genre spécifiques.



Tous les BNL distincts appartiennent à la classe *Proteobacteria*. La plupart d'entre eux appartiennent aux genres de la classe  $\alpha$ -*Proteobacteria* (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Sinorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* et *Shinella*) (Berrada et FikriBenbrahim,2014). Les BNL ont également été identifiés dans la classe  $\beta$ -*Proteobacteria*, notamment chez *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Moulin et al., 2001).

Chaque année, la classification des *Rhizobia* s'enrichit de nouvelles espèces et de nouveaux genres de bactéries, grâce à l'exploration de la diversité des symbiotes associées aux légumineuses dans différentes régions du monde (Krimi et al., 2021).

**Tableau 1 :** Classification simplifiée des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des Légumineuses (Duhoux et Nicole,2004).

<i>Rhizobium</i>		Principales plantes hôtes
Genre	Espèces	
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>	Trèfles,
	<i>Biovar trifolii</i>	Vesce, Pois, Lentille, etc.
	<i>Biovar viciae</i>	Haricot
	<i>Biovarphaseoli</i>	Lupin
	<i>R. lupine</i>	
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. melilotii</i>	Luzerne, Melilot, Trigonelle
	<i>S. fredii</i>	Soja, Vigna
	<i>S. terangaie</i>	Sesbania et Acacias
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	Neptunia natans
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i>	Lotier, Anthyllis, Lupin
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	Tige aérienne de Sesbania rostrata

<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanni</i>	Soja, vigne, Macroptilium
	<i>B. japonicum</i>	Soja, vigne, Macroptilium
<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	Aeschynomene indica
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	Crotalaria
<i>Burkholderia</i>	<i>B. sp.</i>	Aspalathus
<i>Ralstonia</i>	<i>R. taiwanensis</i>	Mimosa

## 2. Les légumineuses

### 2.1. Classification des légumineuses

Les légumineuses nommées également *Fabaceae* sont des plantes herbacées ou des arbres à racines présentant généralement des nodosités qui réalisent une symbiose avec les Rhizobia pour la fixation d'azote (Torche, 2006).

Ce sont des dicotylédones appartenant à la famille des *Fabacées* (Schneider et Huyghe, 2015), c'est la famille végétale qui offre le plus d'espèces alimentaires, industrielles ou médicinales utiles à l'homme (Sebihi, 2008). En effet, elles comprennent 751 genres englobant 19500 espèces réparties en 3 sous familles : les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* (Lewis et al, 2013). Les *Caesalpinioideae* et les *Mimosoideae* regroupent des espèces principalement localisées dans les régions tropicales et subtropicales sous forme d'arbre, ainsi que des lianes et des arbustes (LPWG, 2013). Les *Papilionoideae* rassemblent diverses espèces herbacées qui ont une forte distribution dans la région de la méditerranée, telles que les pois, lentilles et féveroles (Maxted et Bennett, 2001).

### 2.2. Morphologie des légumineuses

Les légumineuses sont formées de deux parties principales, une partie racinaire généralement pivotante, qui permet d'explorer une grande partie du sol, elle est pourvue des nodosités fixatrices d'azote atmosphériques, qui facilitent à la plante l'enrichissement du sol en azote quand les conditions sont favorables (Mémento de l'Agronome, 2006) et l'autre partie est aérienne qui porte des feuilles comprenant de nombreuses folioles et portant des stipules à la base des pétioles (Nezzari et Slimani, 2023). Les inflorescences sont souvent en

grappe, composant des fleurs d'une forme cyclique et dialypétales, des fruits en gousse renfermant des graines (Nemdil et Bergheul, 2020). Ces dernières présentent différentes formes et couleurs. Parmi les plus répandues on trouve les pois, les lentilles, la fève, les haricots et le soja (Schneider et Huyghe, 2015).

### **2.3. La plante légumineuse *Vicia faba*. L**

L'espèce *Vicia faba*. L (Figure 4) est une légumineuse protéagineuse appartenant à la sous famille des *Papilionaceae*s (Pierre et al, 1999). Elle est constituée d'une tige creuse et rigide avec des feuilles portant 2 à 6 folioles (Daoui, 2007), les fleurs sont blanches tachées du noir sur les ailes et les fruits sont des gousses dressées contenant des graines (Beraud, 2007). Il existe 3 types botaniques de l'espèce *V. faba* (Pesson, 1984), différents les uns des autres principalement en termes de taille des graines (Lopez-Bellido, 2005) :

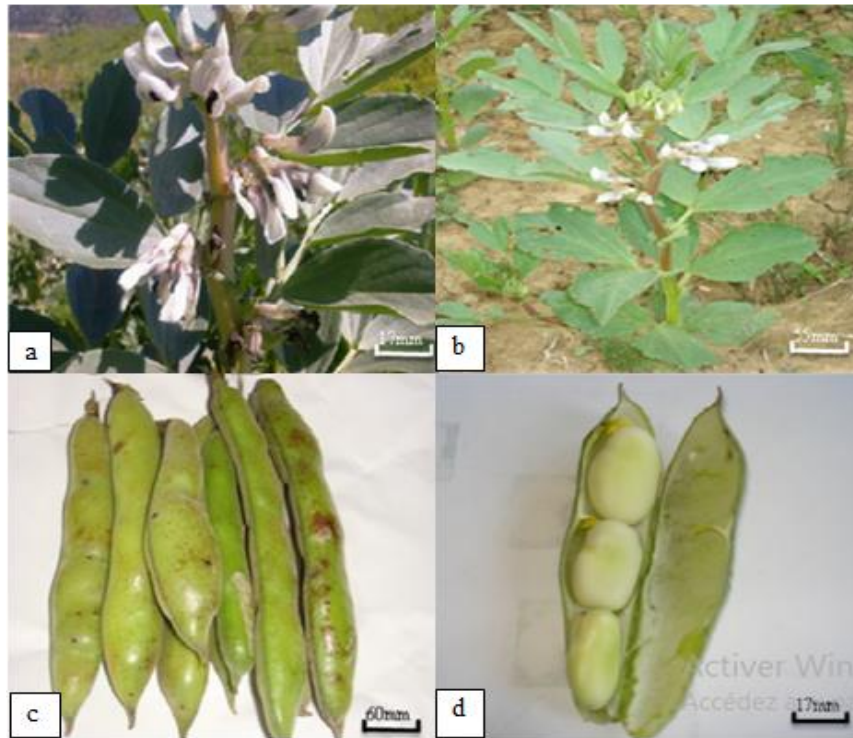
*Vicia faba major* : appelée la fève, qui est cultivée pour l'alimentation humaine.

*Vicia faba minor* : c'est la féverole possédant des graines plus petites.

*Vicia faba equina* : comprenant des graines plus légères que celle de *V. faba major* mais plus lourdes que celle de *V. faba minor*.

La féverole peut avoir jusqu'à 3 gousses par nœud reproducteur, avec environ 3 graines par gousse, tandis que la fève a une seule gousse par nœud qui porte environ 7 graines (Daoui, 2007).

La plante *Vicia faba* a un système racinaire pivotant contenant des nodules renfermant des bactéries du genre *Rhizobium*, qui réalisent avec elles une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique (Duc, 1997) jouant un rôle essentiel dans l'agriculture écologique en diminuant la dépendance des agricultures envers l'utilisation intensive d'engrais chimiques afin de réaliser la protection du sol et la qualité de l'eau (Sillero et al, 2010).



**Figure 4 :** Les fleurs et les fruits de *V. faba L.*

a : Feuilles et fleurs ; b : Tige ; c : gousses récoltées ; d : graines (Mezani, 2010).

### Chapitre II : Fixation biologique de l'azote et symbiose *Rhizobium*-légumineuses

#### 1. Cycle de l'azote

L'azote est considéré comme un nutriment principal indispensable à la croissance et la productivité des plantes (Cleland et Harpole, 2010), il joue un rôle crucial dans la régulation de la composition, de la diversité, de la dynamique et du fonctionnement des espèces dans de nombreux écosystèmes terrestres (Vitousek et *al.*, 1997).

Le total de l'azote se trouve habituellement réparti en trois principaux réservoirs : l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et la biomasse où il est stocké, les interactions complexes entre ces réservoirs sont désignées sous le nom de cycle de l'azote (Hopkins, 2003). Environ 80% de notre atmosphère est constituée d'azote (N). Cependant, les plantes ne peuvent assimiler l'azote que sous forme minérale. Les micro-organismes, qu'ils soient libres ou symbiotiques, ont la capacité de convertir l'azote atmosphérique en  $\text{NH}_4^+$  qui peut être directement absorbé par les plantes, ou en  $\text{NO}_3^-$  par les bactéries nitrifiantes (Davet, 1996 ; Maathuis, 2009).

Le cycle de l'azote est l'un des cycles nutritifs les plus importants dans les écosystèmes terrestres. Il implique quatre processus microbiologiques : la fixation de l'azote, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification (figure 5) (Hayatsu et *al.*, 2008).

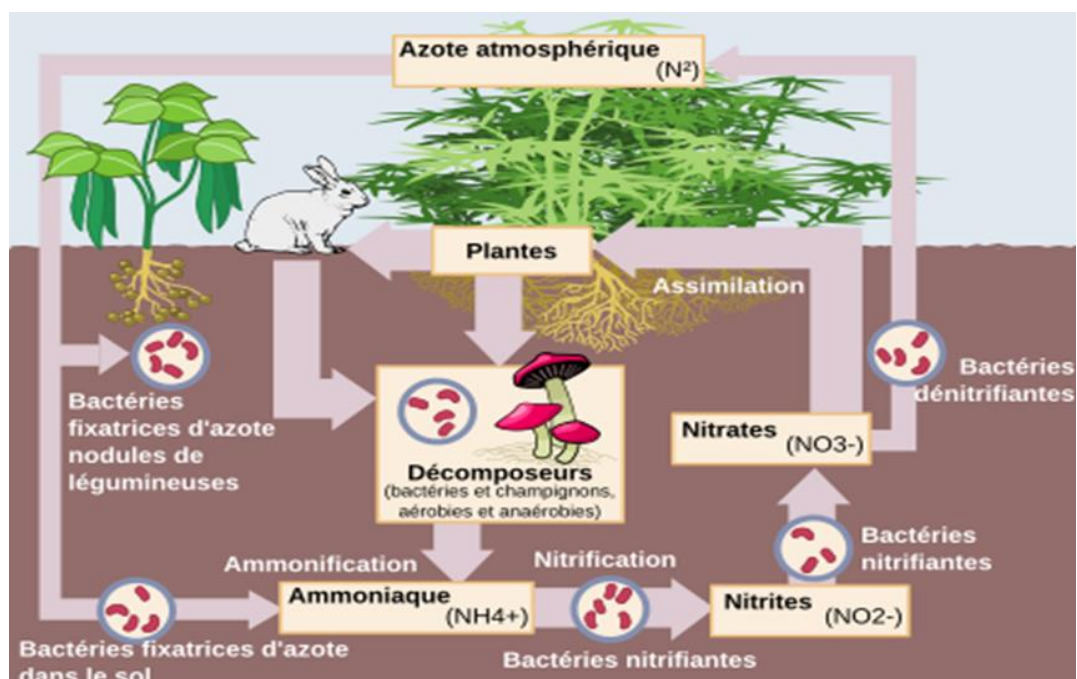


Figure 5 : Cycle de l'azote (Pujic, 2009).

## **Chapitre 2 : Fixation biologique de l'azote et symbiose rhizobium-légumineuses**

---

### **1.1. Fixation de l'azote**

La fixation d'azote est le processus par lequel les microorganismes transforment l'azote moléculaire en azote ammoniacal. On distingue la fixation libre d'azote réalisée par des bactéries aérobies (*Azotobacter sp.*) ou anaérobies (*Clostridium sp.*), des algues bleues (*Cyanophycées*), et la fixation symbiotique qui est due à l'association symbiotique entre les légumineuses et les bactéries du genre *Rhizobium* (Recous et *al.*, s.d.).

### **1.2. Ammonification**

L'ammonification implique la transformation de l'azote organique en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) grâce à l'activité de micro-organismes hétérotrophes, qui utilisent des composés carbonés comme source d'énergie (Valé, 2006), notamment les bactéries, les champignons et les actinomycètes (Scheiner, 2005). Cette forme d'azote est généralement transitoire et sera ultérieurement transformée en nitrate.

### **1.3. Nitrification**

C'est un processus aérobie strict réalisé en deux étapes principales par deux genres à Gram négatif et chimiolithoautotrophes, *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* (Sprent, 1987). Tout d'abord, les bactéries du genre *Nitrosomonas* oxydent les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), ensuite les nitrites sont réduits en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) par des bactéries du genre *Nitrobacter* (Machefert et *al.*, 2002).

### **1.4. Dénitrification**

La dénitrification est le processus anaérobie par lequel les bactéries dénitrifiantes réduisent l'azote en gaz diazote ( $\text{N}_2$ ) qui retourne ensuite à l'atmosphère (Barton et *al.*, 1999). Les bactéries dénitrifiantes (*Pseudomonas* et *Bacillus*) peuvent utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons lorsque l'oxygène du sol est limitant (Morot-Gaudry, 1997). La dénitrification requiert l'utilisation de matière organique en tant que source d'énergie et de carbone (Lewis, 1986).

## **2. La symbiose fixatrice d'azote**

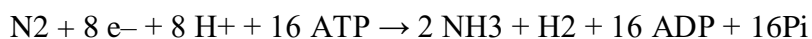
La fixation biologique de l'azote atmosphérique est un processus impliquant l'association des *Rhizobia* avec les racines des légumineuses afin d'établir deux étapes clés : la formation des nodosités (Fossou, 2019) et la conversion de l'azote moléculaire en ammoniac

## **Chapitre 2 : Fixation biologique de l'azote et symbiose rhizobium-légumineuses**

---

(NH<sub>3</sub>) en utilisant l'enzyme nitrogénase (Morot-Gaudry et *al.*, 2017). Cet enzyme est un complexe enzymatique qui comprend deux métalloprotéines appelées la dinitrogénase, qui contient le site de réduction du nitrogène en ammoniac (MoFe) et la dinitrogénase réductase (protéine Fe) qui permet le transfert d'électrons libérés (Halbleib et Ludden, 2000).

La réaction globale de la réduction d'azote en ammoniac est décrite dans l'équation suivante :



Cette réaction enzymatique représente environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique réintroduites annuellement dans le cycle de la vie grâce à la fixation biologique (Roger et *al.*, 1996).

### **3. Nodulation**

La formation des nodosités représente la première caractéristique de ces interactions, régulées de manière stricte par les mécanismes interne d'autorégulation de la plante hôte (Fitouri, 2011).

#### **3.1. Processus de formation des nodules**

Lors de la fixation biologique de l'azote, des nodules ou nodosités se forment sur les racines des plantes (figure 6). Ces structures résultent de l'infection des racines par des bactéries, un processus appelé nodulation. L'infestation des racines par les Rhizobium est connue sous le nom d'infection et précède la formation des nodules (Dreyfus, 1982).



**Figure 6 :** les nodules chez les légumineuses

(<https://biology.anu.edu.au/news-events/news/nodulation-legumes>)

## **Chapitre 2 : Fixation biologique de l'azote et symbiose rhizobium-légumineuses**

---

Cette relation particulière se manifeste probablement à travers diverses étapes d'infection qui aboutissent à la formation de nodules fixateurs d'azote :

### **3.1.1. Pré-infection**

Les *Rhizobia* peuvent persister dans le sol pendant de longues périodes sans avoir besoin d'une plante hôte. Cependant, pour établir une symbiose, les partenaires végétaux et bactériens doivent communiquer. Cette interaction spécifique dépend de signaux échangés entre les légumineuses et les *Rhizobia* à différentes étapes. Initialement, les légumineuses libèrent des composés de signalisation, comme les flavonoïdes, dans le sol, auxquels les *Rhizobia* répondent en produisant des facteurs de nodulation (Ma et *al.*, 2002). Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitino oligosaccharides ou LCO) (Menadi et Boumaza, 2016). Les exsudats attirent les bactéries (rhizobia) qui à leur tour, augmentent la taille et sécrètent des facteurs de nodulation (Maroc et Tolosan cedex, 2014). Ces facteurs, souvent des lipopolysaccharides, stimulent la formation de nodules chez les plantes (Ma et *al.*, 2002).

LCO se lie à un récepteur contenant la lysine (LysM), déclenchant ainsi la voie de signalisation symbiotique commune (VSSC). Cette voie est présente dans divers types de symbioses, notamment les actinorhizes, les légumineuses, les non-légumineuses et les mycorhizes. Après l'activation de la VSSC, les facteurs de transcription (FT) interviennent pour réguler le processus de nodulation, agissant en aval de cette voie de signalisation (Cerri et *al.*, 2017 ; Diedhiou et *al.*, 2022). Ces molécules LCO provoquent divers changements cellulaires, notamment des oscillations de calcium dans le cytoplasme, une caractéristique partagée par les espèces nodulantes telles que les légumineuses (Zipfel et Oldryd, 2017).

### **3.1.2. Infection**

Les poils absorbants infectés se tordent pour former une structure en forme de croix où les bactéries se multiplient. C'est là que la paroi du poil se brise et forme un cordon d'infection. Ce cordon avance guidé par le noyau de la cellule qui se déplace vers la base du poil, puis passe à travers les parois cellulaires en direction du méristème nodulaire. Des cellules spécifiques dans le cortex externe de la racine agissent comme des guides pour la progression de ce cordon. Il se ramifie ensuite et transporte les rhizobia dans les cellules du méristème nodulaire par endocytose (Duhoux et Nicole, 2007).



### 3.1.3. Organogenèse des nodules

Une distinction particulière est faite dans la coexistence légumatique au niveau de l'organogenèse nodulaire (figure 7). Des divisions cellulaires sont créées dans le cortex racinaire des légumineuses et dans les pérycles des plantes, ils mènent à la formation primitive nodale. Ce processus est similaire à la formation des racines latérales. Comme dans le cas de *Rhizobia*, les bactéries demeurent dans des structures semblables à des cordes d'infection avant d'être libérées dans le cytoplasme des cellules hôte (Diedhiou et *al.*, 2022), provoquant ainsi la formation de méristème, qui est une zone de multiplication cellulaire dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes ou endosymbiose (Gharzouli, 2006).

Les bactéroïdes sont isolés du cytoplasme de la plante par une membrane spécialisée appelée "péri bactéroïdes" ou membrane de séquestration. Cette membrane agit comme une plaque d'échange entre les bactéries et les cellules de la plante hôte. À l'intérieur de cette membrane, les bactéries différenciées se transforment en bactéroïdes responsables de la fixation de l'azote.

Le développement du nodule commence par la prolifération des cellules du cortex, qui s'enrichissent de pigments connus sous le nom de leghémoglobine, produite dans le cytoplasme des cellules végétales (Corbière, 2002). La leghémoglobine joue un rôle crucial en maintenant une faible concentration d'oxygène autour de l'enzyme, ce qui favorise la fixation de l'azote (Nouari et Riabi, 2014)

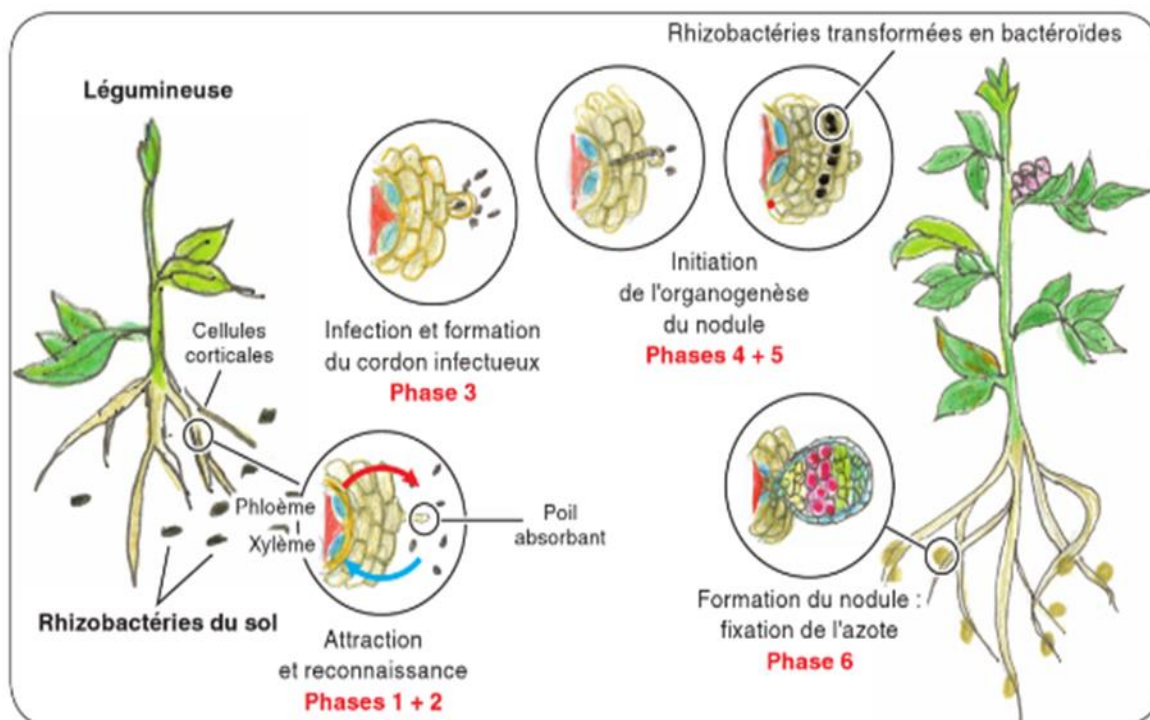


Figure 7 : Formation des nodules fixateurs d'azote (Suty, 2015).

### 3.2. Types de nodules

Selon le type de légumineuse, deux types de nodules peuvent se former. Chacun de ces types de nodules suit un processus de développement distinct, ce qui leur confère des caractéristiques propres (figure 8).

#### ☞ Les nodules de type indéterminé

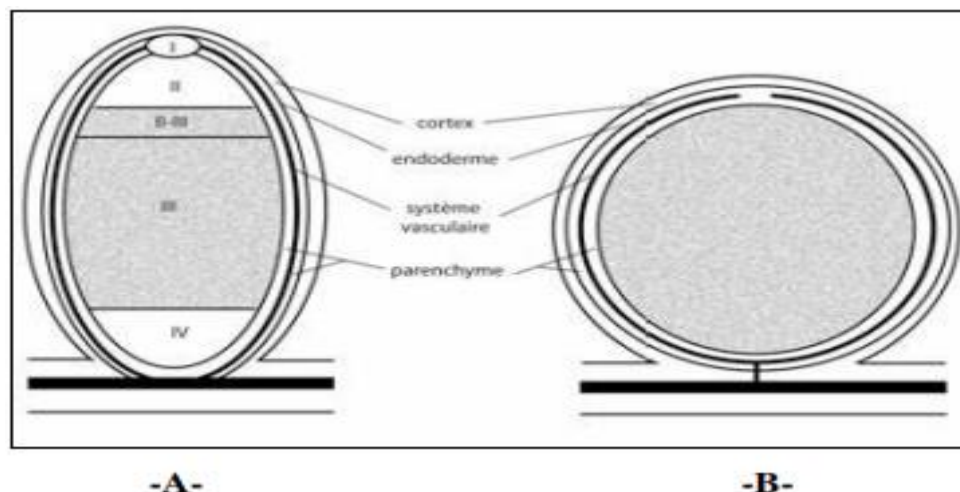
Les légumineuses provenant de climats tempérés, telles que la luzerne, le pois ou le trèfle, produisent des nodules qui se forment à partir des cellules du cortex interne (Vernié, 2008). Les nodules indéterminés contiennent un méristème persistant qui provoque la formation d'une structure cylindrique, tels que ceux produits par le pois de jardin (*Pisum sativum*) (Ma et al., 2002).

#### ☞ Les nodules de type déterminé

Les nodules déterminés, tels que ceux que l'on trouve sur les racines de plantes comme le soja et le haricot commun, ne forment pas de méristème persistant et restent donc sphériques. Ils peuvent également se trouver sur les tiges de légumineuses tropicales telles que *Sesbania rostrata*.

## Chapitre 2 : Fixation biologique de l'azote et symbiose rhizobium-légumineuses

Malgré leurs différences, tous les nodules se forment à l'avant des pôles xylémiques, permettant ainsi des connexions aux systèmes vasculaires des plantes hôtes (Hadri et *al.*, 1998).



**Figure 8 :** Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes.

A : Nodule de Légumineuse de type indéterminé. B : Nodule de Légumineuse de type déterminé. I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone II-III ; IV : zone de sénescence. (Chabbi, 2010).

### 3.3. Les facteurs Nod

La plante hôte sécrète des flavonoïdes dans le sol qui sont détectés par le *Rhizobium* grâce à une protéine régulatrice (NodD). Cette protéine entraîne l'expression des gènes nod, conduisant à la synthèse d'une molécule signal appelée facteur Nod (FN) (Guiraud, 2007).

Les facteurs Nod (NFs) sont des molécules symbiotiques de nature lipochitooligosaccharidiques (Lerouge et *al.*, 1990). Ils sont composés d'un squelette de chitine, formé par des unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4, avec un nombre d'unités variant entre trois et cinq (Dénarié, 1996). Trois gènes de nod (nod A, nod B, nod C) sont des éléments nodulaires présents chez tous les *Rhizobia*, responsables de la formation du squelette oligosaccharidique des facteurs de nodulation (Hopkins, 2003).

Ces signaux jouent un rôle crucial dans le développement symbiotique entre les *Rhizobia* et les légumineuses, en leur absence, les *Rhizobia* sont incapables de pénétrer dans les racines des légumineuses. Ils peuvent déclencher diverses réponses chez la plante,

## **Chapitre 2 : Fixation biologique de l'azote et symbiose rhizobium-légumineuses**

---

commela déformation des poils des racines et la division des cellules corticales (Cooper, 2007). Ils agissent comme des déclencheurs de la formation des nodules racinaires (Franche et *al.*, 2009), ils peuvent aussi agir comme des régulateurs de croissance spécifiques chez les légumineuses hôtes (Roche et *al.*, 1996)

## Chapitre 3 : Les antibiotiques

---

### Chapitre III : Les antibiotiques

#### 1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques élaborées par des micro-organismes, capables d'inhiber la croissance des bactéries et d'autres micro-organismes et même de les détruire (Waksman, 1947), ce qui leur donne respectivement le nom de bactériostatique ou de bactéricide (Walsh, 2000). Ils constituent vraisemblablement l'une des formes de chimiothérapie les plus performantes de l'histoire de la médecine (Clardy et *al.*, 2009).

La majorité des antibiotiques que nous utilisons actuellement comme antibactériens ont des substances naturelles, synthétisées par certaines bactéries ou champignons. À partir de ces composés naturels, diverses modifications semi-synthétiques ont donné naissance à de nouveaux antibiotiques de deuxième et troisième génération, par ailleurs, quelques antibiotiques sont entièrement synthétiques (Walsh, 2000).

#### 2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques ont été classés en différentes classes (tableau 2) (Wilson, 2019).

**Tableau 2** : les principales classes d'antibiotiques (Wilson, 2019).

Classes	Exemples
Sulfonamides	Sulfaméthoxazole
Bêta-lactamines	Pénicilline, ampicilline, céphalosporines, carbapénèmes (par ex. méropénème)
Chloramphénicol	Chloramphénicol
Tétracyclines	Doxycycline, minocycline, tigécycline
Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, tobramycine
Macrolides	Érythromycine, azithromycine
Glycopeptides	Vancomycine, teicoplanine
Quinolones	Acide nalidixique, ciprofloxacine, moxifloxacine
Streptogramines	Synercide (association de dalfopriline A et de quinupristine B)
Oxazolidinones	Linézolide, tédizolide (anciennement torezolid)
Lipopeptides	Daptomycine
Polycétides	Kifampine
Diarylquinoléines	Bédaquiline

### 3. Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent en perturbant différentes fonctions essentielles chez les bactéries. Ces actions incluent l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, ou de la synthèse de l'acide nucléique, inhibition de la fonction ribosome, ou modification de la membrane cellulaire et inhibition du métabolisme des folates (Dowling *et al.*, 2017). Les antibiotiques bloquent le développement des micro-organismes sensibles en empêchant l'action d'une macromolécule indispensable au fonctionnement cellulaire. Cela implique une fixation de l'antibiotique à un site spécifique sur la cible macromoléculaire, créant ainsi un complexe moléculaire non fonctionnel (Lancini *et al.*, 2013).

#### ➤ Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire :

Certains antibiotiques, comme la pénicilline et la vancomycine, interfèrent avec la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries en formant des complexes covalents avec les enzymes nécessaires à la production de la couche de peptidoglycane. Cela empêche la formation de la molécule de peptidoglycane mature, affaiblissant ainsi la paroi cellulaire bactérienne et entraînant la mort de la bactérie en raison de la pression osmotique (Naamala *et al.*, 2016).

#### ➤ Perturbation de la structure de la membrane bactérienne :

Elle résulte sous l'action des lipopeptides tels que les polymyxines qui agissent principalement en perméabilisant la membrane externe par liaison au lipopolysaccharides (Peach *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2019).

#### ➤ Inhibition de la synthèse des acides nucléiques :

Certains antibiotiques notamment les quinolones (comme la ciprofloxacine), le métronidazole et la nitrofuratoïne inhibent la fabrication de l'ADN. En effet, les quinolones empêchent l'action de l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui sont responsables de la réplication de l'ADN, ce qui entraîne des dommages au niveau de l'ADN provoquant ainsi la mort cellulaire (Kaufman, 2011).

#### ➤ Inhibition de la synthèse des folates :

## Chapitre 3 : Les antibiotiques

---

L'antibiotique peut bloquer la voie de synthèse de l'acide folique dans les bactéries. Par exemple, le triméthoprim est un antibiotique synthétique qui inhibe la production d'acide folique en se fixant à la dihydrofolate réductase (Lansing et *al.*, 2018).

➤ **Inhibition de la synthèse protéique :**

De nombreux antibiotiques agissent sur la bactérie en bloquant la synthèse des protéines bactériennes (Gerrits et *al.*, 2002), où l'agent antibiotique cible le ribosome pour inhiber la traduction des protéines (Alekhshun et Levy, 2007). De fait, les tétracyclines comme la tigécycline se lient à la sous unité 30S du ribosome en empêchant la liaison productive des aminoacyl-ARNt chargés au site ribosomique A (Sasse, 2016). Les macrolides ciblent la sous unité 50S ribosomique en inhibant le fonctionnement des ribosomes (Peach et *al.*, 2013).

Les différents types d'antibiotiques sont classés en fonction de leur mécanisme d'action (tableau 3).

**Tableau 3:** Mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques (Todar, 2004).

Modes d'action	Familles d'antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi Cellulaire	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, daptomycines, monobactames, glycopeptides
Inhibition de la synthèse protéique	Tétracyclines, aminoglycosides, oxazolidonones, streptogramines, kétolides, macrolides, lincosamides
Inhibition de la synthèse de l'ADN	Fluoroquinolones
Inhibition compétitive de la synthèse de l'acide folique (folates)	Sulfonamides, triméthoprim
Inhibition de la synthèse de l'ARN	Rifampine

### 4. Résistance des *Rhizobia* aux antibiotiques

Il existe plusieurs facteurs biotiques et abiotiques qui influencent la colonisation de souches rhizobiales dans le sol, leur potentiel infectieux et leur efficacité symbiotique. Ces facteurs incluent la présence d'antibiotiques provenant d'organismes producteurs d'antibiotiques ainsi que des excréments, tels que les fèces et les urines animales (Naamala et *al.*, 2016).

#### 4.1. Mécanismes de résistance des *Rhizobia* aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques chez les *Rhizobia* implique différents mécanismes (figure 9) :

- **Modification du site cible des antibiotiques :**

Les *Rhizobia* ont la capacité de modifier ou d'altérer les sites cibles des antibiotiques par mutation, par exemple, la mutation des éléments de liaison clés tels que l'ARN ribosomique (Wright, 2005). Une résistance aux fluoroquinolones et à la coumarine est acquise par les bactéries à Gram négatif, y compris les *Rhizobia*, par une mutation de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV. Par ailleurs, certaines bactéries développent une résistance aux  $\beta$ -lactamines suite à des mutations dans le PBP cible ou l'acquisition de nouveaux PBP ayant une affinité réduite pour l'agent antimicrobien (Mc Dermott et *al.*, 2003).

- **Modification enzymatique :**

La bactérie produit des enzymes modificatrices qui ciblent spécifiquement et neutralisent l'efficacité des antibiotiques (Wright, 2005). En effet, elle peut acquérir des gènes de résistance qui codent des enzymes comme les  $\beta$ -lactamases qui sont capables de détruire l'agent antibactérien sous une forme non toxique pour la cellule bactérienne avant qu'il n'atteigne son site cible (Hastings et *al.*, 2004 ; Tenover, 2006). Les  $\beta$ -lactamases sont capables d'inactiver les antibiotiques comme les pénicillines par hydrolyse (Wright, 2007).

En ce qui concerne la résistance bactérienne aux aminoglycosides, six gènes ont été identifiés dont *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* et *npmA*, codant leurs enzymes respectives (Doi et *al.*, 2008).



## Chapitre 3 : Les antibiotiques

---

- **Développement des pompes à Efflux :**

Les bactéries peuvent développer des pompes d'efflux qui éjectent l'agent antibactérien hors de la cellule avant qu'il puisse atteindre son site d'action et exercer son effet (Tenover, 2006). Ce processus nécessite l'énergie sous forme d'ATP. L'agent antibiotique est expulsé du système bactérien sans être altéré ou dégradé. Ce mécanisme peut engendrer la résistance à plusieurs antibiotiques, car une seule pompe à efflux peut éliminer plusieurs types d'antibiotiques (Naamala et *al.*, 2016).

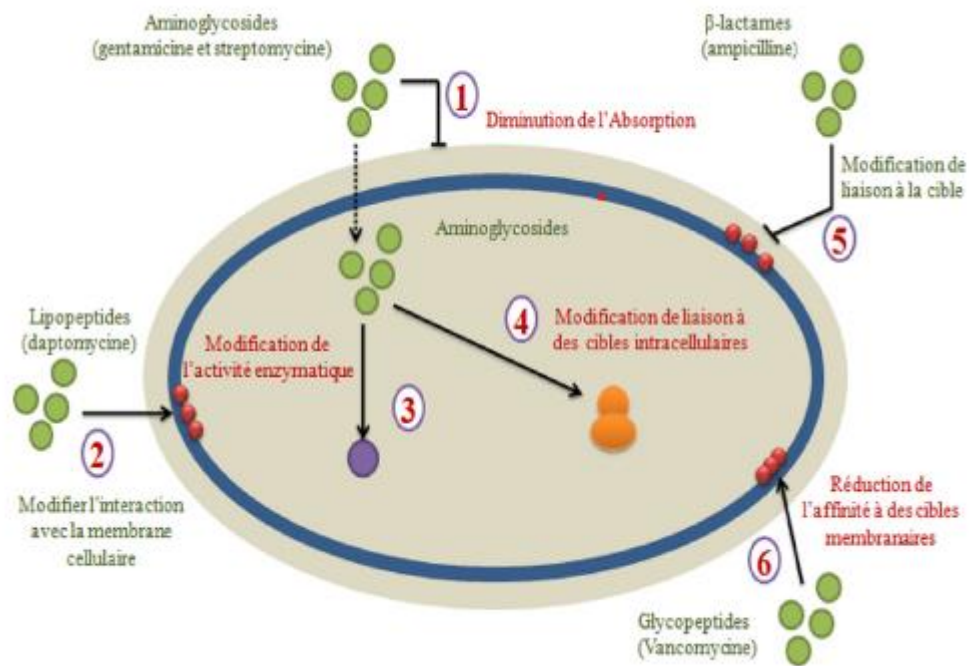
Il existe cinq familles de pompes à efflux : la famille résistance-nodulation-division cellulaire (RND) qui comprend deux pompes à efflux de méta-résistance présentes dans les gènes de la bactérie *Aicaiigenes eutrophus* (CzcA et CnrA), et trois protéines qui agissent conjointement dans le processus de nodulation des racines de luzerne par *Rhizobium meliloti* (NolGHI), la famille des protéines de fusion membranaire potentielles (MFP) inclut une protéine de nodulation (NolF), une protéine de division cellulaire (EnvC), et une protéine de transport multi-résistance (EmrA) (Saier et *al.*, 1994).

Également, la famille des cassettes à liaison ATP (ABC), les facilitateurs majeurs (MFS) (Pao et *al.*, 1998) et la petite famille de protéines multirésistantes (SMR) (Paulsen et *al.*, 1996). Les organisations des systèmes d'efflux basés sur RND, présents dans plusieurs bactéries à Gram négatif (*Rhizobium*), leur permettent de transporter des médicaments depuis le cytoplasme à travers les membranes internes et externes de l'enveloppe cellulaire (Aleksun et Levy, 2007).

- **Altération et modification de la perméabilité de la paroi cellulaire :**

Les bactéries rhizobiales peuvent développer des mutations qui restreignent l'accès des agents antimicrobiens au site cible à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, les bactéries ont la capacité d'acquérir divers gènes impliqués dans une voie métabolique conduisant à la production de parois cellulaires bactériennes altérées, dépourvues de sites de liaison pour l'agent antibiotique (Tenover, 2006). De ce fait, l'antibiotique est expulsé de la cellule bactérienne (Maiden, 1998).

## Chapitre 3 : Les antibiotiques



**Figure 9** : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahya et *al.*, 2017).

**MATÉRIELS ET  
MÉTHODES**

## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

---

### Chapitre IV : Matériel et Méthodes

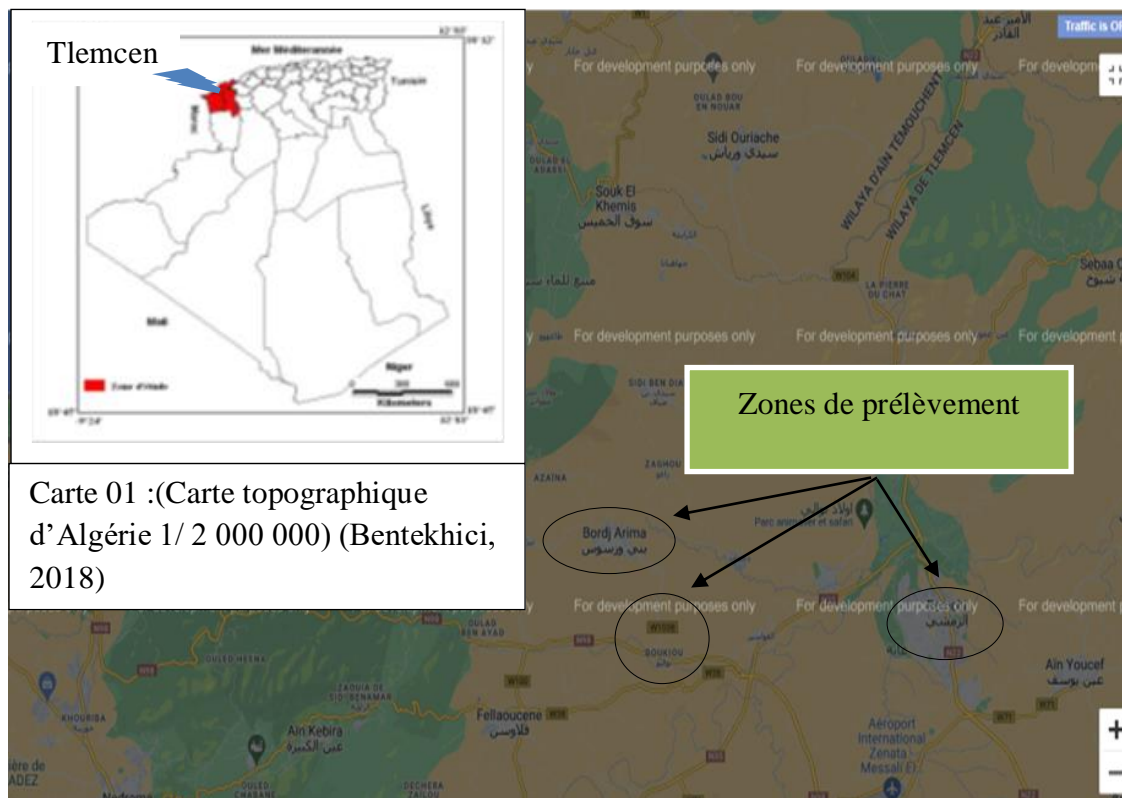
#### 1. Isolement des bactéries nodulant la fève (*Vicia faba* L.)

##### 1.1. Description de la zone d'étude

L'étude a porté sur des plantes légumineuses de fève dans trois régions de la wilaya de Tlemcen différentes sur le plan climatiques et pédologiques (tableau 4), le premier prélèvement a été effectué dans la région de Boukiou, tandis que le second échantillon a été récolté dans la région de Remchi. Bordj Arima est la 3ème région dans laquelle l'échantillon a été prélevé (figure 10).

**Tableau 4** : Les coordonnées géographiques de Bordj Arima [1], Remchi [2] et Boukiou [3].

		Bordj Arima	Remchi	Boukiou
Coordonnées Géographiques	Latitude	35° 4' 60" Nord	35° 3' 0" Nord	34°59'52" et 35°6'42"Nord
	Longitude	1° 33' 26" Ouest	1° 25' 60" Ouest	1°29'41"W et 1°43'32"W
	Altitude	295 m	213 m	850 m
	Climat	Climat semi-aride sec et froid		Climat semi-aride



**Figure 10** : localisation géographique de la zone prélèvement [4]

### 1.2. Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être effectuée à un moment précis, avec la collecte planifiée entre le mois de février et mars 2024 (figure 11).



**Figure 11** : Collecte des nodules

A : Figure du site de prélèvement ; B : champ de nodule de la fève

## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

---

La collecte est effectuée suivant la méthode de Somasegaran et Hoben (1994) qui consiste à :

A l'aide d'une bêche, tracez un cercle d'environ 15 cm de rayon autour de la plante et découpez cette partie à une profondeur d'au moins 20 cm, puis soulevez doucement la touffe. Retirez soigneusement le sol de la racine en utilisant vos mains. Veuillez éviter de retirer les racines secondaires de la plante (figure 12), car il est possible de repérer des nodules sur les racines latérales ainsi que sur la racine pivotante. Disposez avec précaution la plante complète dans un sac en plastique.

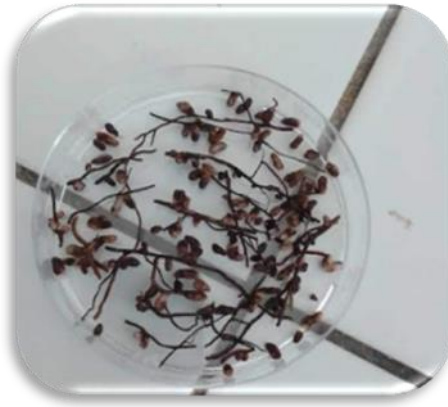


**Figure 12** : plante extraite avec son appareil racinaire.

Au laboratoire, les racines de la plante sont lavées abondamment à l'eau du robinet afin d'enlever l'excès de terre, puis elles sont enveloppées sur du papier absorbant. On extrait les nodules en utilisant des ciseaux en laissant quelques millimètres de racine de chaque côté du site d'attache des nodules. Cette méthode préserve l'intégrité des nodules et améliore les probabilités de cultiver des bactéries saines et viables.

### 1.3. Conservation des nodules

Les nodules séchés doivent être conservés au réfrigérateur à une température de 4°C en vue d'une utilisation immédiate (Temam et Alebejo, 2017) (figure 13).



**Figure 13 :** Nodules conservés sous 4°C

### **1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules**

#### **1.4.1. Stérilisation des nodules**

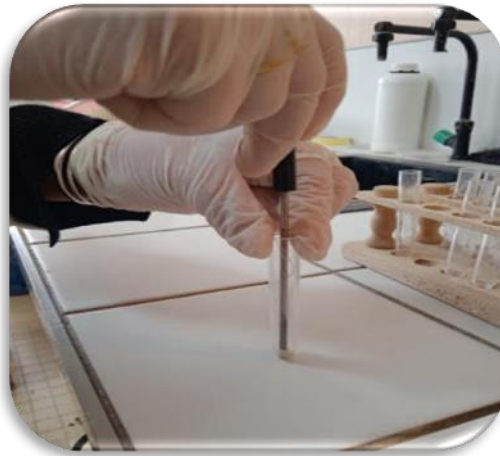
Toutes les manipulations ont lieu à proximité d'un bec Bunsen, afin de garantir des conditions totalement stériles.

Les nodules sont d'abord immergés dans de l'éthanol à 95 % pendant 5 à 10 secondes (pour briser la tension superficielle et éliminer les bulles d'air des tissus). Ensuite, ils sont transférés vers une solution d'hypochlorite de sodium à 2,5 à 3 % pendant 2 à 4 minutes. Après cela, les nodules sont soigneusement rincés à l'eau distillée stérile (5 fois) à l'aide de pinces stériles pour le transfert (Somasegaran et Hoben, 1994).

#### **1.4.2. Ecrasement des nodules et ensemencement**

Devant le bec Bunsen, chaque nodule a été écrasé dans un tube à hémolyse stérile contenant 2 gouttes d'eau distillée stérile en utilisant une barre stérilisée afin d'obtenir une suspension de bactéroïdes (figure 14). A l'aide d'une anse de platine, une goutte de l'homogénéité obtenue a été prélevée et étalée sur une boîte de Pétri contenant le milieu YMA (Ouslim et *al.*, 2015 ; Benidire et *al.*, 2018).

L'ensemencement a été réalisé selon la méthode des cadrans afin d'obtenir des colonies bien isolées et les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant 48 à 72 heures (Benidire et *al.*, 2018).



**Figure 14** : L'écrasement des nodules

## 2. Caractères morphologiques et culturaux de *Rhizobium*

### 2.1. Principaux milieux utilisés (Annexe 01)

Les bactéries requièrent différentes sources d'énergie pour leur croissance, pour cela nous avons préparé les milieux de culture spécifiques suivants :

- Milieu liquides: YMB (Yeast Mannitol Broth)
- Milieux solides: YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar + Bromocrésol Pourpre)

### 2.2. Purification des isolats

Une fois les nodules isolés, on peut observer différents aspects des colonies sur les boîtes, ce qui permet de détecter différentes formes microscopiques. Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une série de repiquage sur le même milieu (YEMA + RC) afin d'obtenir des souches pures (Somasegaran et Hoben, 1994).

La purification des souches a été obtenue par repiquage successif sur le bouillon YMB puis le milieu YMA+ RC (Annexe 01), l'incubation se fait à 28 °C pendant 48 à 72 heures.



## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

---

### 2.3. Examen de la mobilité à l'état frais

Cet examen permet d'observer la mobilité des bactéries ; Il s'agit de déposer une gouttelette d'eau distillée sur une lame, prélever un échantillon de culture à l'aide d'une anse de platine et le disperser dans le liquide. Puis, Couvrir avec une lamelle et faire l'observation x 40.

### 2.4. Examen microscopique après coloration de Gram

Cet examen nous permet de différencier les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif, ainsi que de caractériser la morphologie des cellules bactériennes.

### 2.5. Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

Après avoir réalisé des frottis sur lame pour chaque colonie suspecte, nos échantillons ont été observés au microscope électronique à balayage de type Hitachi TM1000 (Faculté des sciences, Université de Tlemcen).

### 2.6. Croissance sur YMA contenant du bleu de bromothymol (BTB)

Chaque souche testée a été cultivée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur coloré de pH. Après cinq jours d'incubation à 28°C, la souche rhizobienne peut être identifiée comme acidifiante (couleur jaune) ou alcalinisante (couleur bleue). Il est possible de supposer que les Rhizobia à croissance rapide et lente sont responsables respectivement de l'acidification et de l'alcalinisation du milieu (Ouslim et *al.*, 2015).

### 2.7. Croissance sur milieu Glucose-Peptone-Agar (GPA)

Le milieu de glucose-peptone-agar est utilisé pour distinguer les Rhizobia, qui présentent généralement peu ou pas de croissance sur ce milieu sans modifier le pH du milieu. En revanche, des contaminants comme *Agrobacterium* montrent une croissance abondante accompagnée d'une modification significative du pH (virage du couleur du milieu au jaune) (Benselama et *al.*, 2018).

La technique consiste à :

- Préparer le milieu GPA (annexe 1) (Somasegaran et Hoben, 1985).

## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

---

- Ajouter 5 ml de la solution de pourpre de bromocrésol (BCP) (annexe 1) à un litre du milieu GPA.
- Ensemencer les souches par stries sur des boîtes contenant du GPA additionné de BCP, puis incuber à 28°C pendant 24 (Baba Arbi, 2016).

### 3. Caractères biochimiques

#### 3.1. Test de la catalase

Le test de la catalase est fondamental pour orienter les souches rhizobiennes, cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries.

Ce test consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et la mélanger dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame stérile. La présence de catalase se manifeste par un dégagement immédiat des bulles de gaz (Joffin et Leyral, 2001).

#### 3.2. Test de l'oxydase

Le principe consiste à immerger une bandelette dans l'eau physiologique, puis, à l'aide d'une anse de platine prélever une colonie et la déposer sur la bandelette. La mise en évidence de l'oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration bleue violette dans un délai de 30 secondes (Joffin et Leyral, 2001).

#### 3.3. Test du citrate de Simmons

L'utilisation du citrate par les isolats a été déterminée par leur croissance sur les pentes de gélose au citrate de Simmons. Un virage de couleur du vert au bleu, indique un résultat positif pour le test d'utilisation du citrate (Joffin et Leyral, 2001).

#### 3.4. Test du nitrate réductase

Certaines bactéries possèdent une enzyme spécifique appelée « nitrate réductase » qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite (Neyra, 1992).

Ce test a pour but de détecter l'enzyme nitrate réductase en ensemençant un tube de bouillon nitraté (bouillon nutritif supplément de 1,5% de nitrate de potassium) avec la bactérie à étudier (*Rhizobium*), puis on incube à 37°C. Après une incubation de 18 à 24 heures, on ajoute 3 gouttes du réactif sulfanilique + acide acétique (nitrate1) et 3 gouttes du réactif alpha-naphtylamine + acide acétique (nitrate2) (Naidji et Benguedouad, 2020).

## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

---

Une coloration rouge indique la présence de NO<sub>2</sub>, ce qui signifie que la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase.

En l'absence de coloration, on ajoute de la poudre de zinc : si une coloration rouge apparaît, cela indique que la poudre de zinc a réduit les nitrates en nitrites, ce qui signifie que la bactérie est nitrate réductase négative. Si aucune coloration n'est présente, donc la bactérie présente une activité nitrate réductase positive (Naidji et Benguedouad, 2020).

### 4. Conservation des isolats

Deux méthodes de conservation ont été utilisées :

- a. Conservation à court terme : les souches ont été ensemencées par des stries régulières sur gélose inclinée (YMA) dans des tubes à essais. Après 72h d'incubation à 28 °C, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à une température de 4 °C (Benselama et al., 2018).
- b. Conservation à long terme : Pour une conservation pouvant aller jusqu'à un an, les souches sont conservées dans du glycérol (qui est un cryoprotecteur) à 50 % (v/v) en utilisant des tubes à Eppendorf stériles (Baba Arbi, 2016).

### 5. Sensibilité aux antibiotiques

L'objectif de ce test a été l'étude de la sensibilité des isolats vis-à-vis de 14 différents antibiotiques.

Le test a été réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA :

- À partir d'une culture de 24 heures sur milieu gélosé, prélever une colonie bien isolée et identique,
- Dissocier dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis
- Homogénéiser au vortex.
- Ensemencer les boîtes par écouvillonnage.
- Les disques d'antibiotiques à tester (tableau 5) sont ensuite déposés, et les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 28 °C.
- Après incubation, une lecture est effectuée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition pour chaque antibiotique.

## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

---

**Tableau 5** : Différents antibiotiques testés.

Antibiotiques	Abréviations	Familles	Charges
Cephalotine	KF	Bêta-lactamines	30 µg
Ceftriaxone	CRO		30µg
Piperacilline	PRL		100µg
Ceftazoline	CPT		5µg
Amoxicilline	AMC		30 µg
Nitrofurantoïne	F	Nitrofuranes	300 µg
Tigécycline	TGC	Tétracyclines	15 µg
Télithromycine	TEL	Kétolides	15 µg
Néomycine	N	Aminosides	30 µg
Lincomycine	MY	Lincosamides	2 µg
Spectinomycine	SPC	Aminocyclitols	100 µg
Métronidazole	MTZ	Nitroimidazoles	5 µg
Norfloxacin	NOR	Quinolones	10 µg
Triméthoprim	TM	Diaminopyrimidines	2,5 µg

# **RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

## Chapitre V : Résultats et Discussion

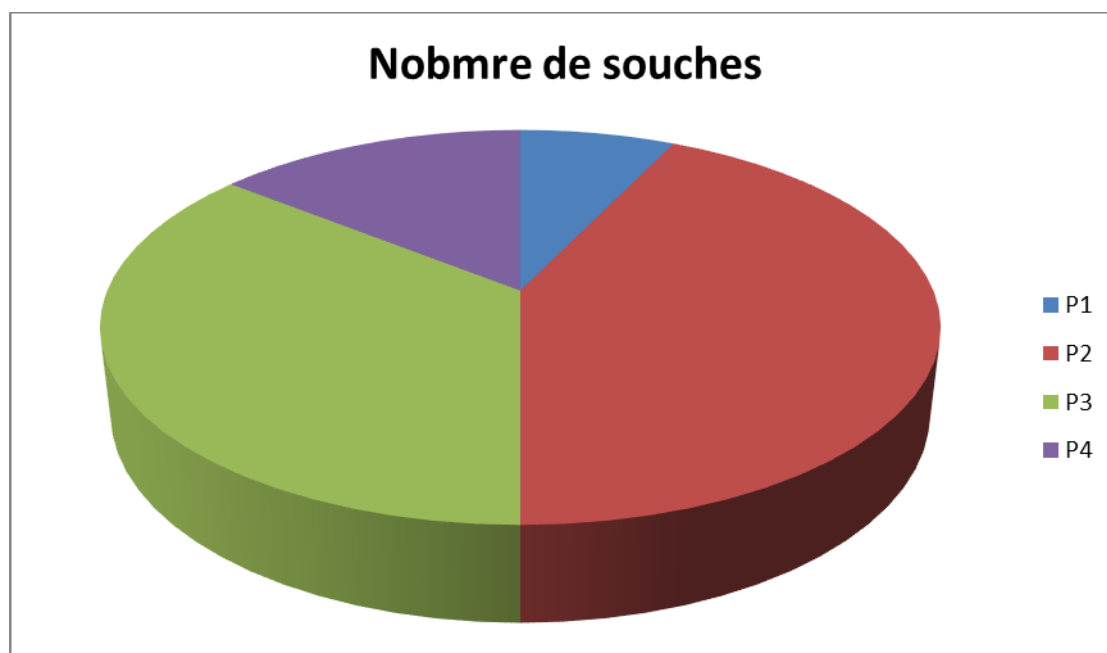
### Chapitre V : Résultats et Discussion

#### 1. Isolement des souches

Dans cette étude, nous avons analysé 14 isolats collectés de trois (03) régions de la wilaya de Tlemcen (Bordj Arima, Remchi, Boukiou) (figure 15), provenant des nodules fraîchement prélevés de la plante légumineuse *Vicia faba*. L, récoltée pendant la période de février-mars. Le tableau n°6 représente le nombre de souches isolées pendant notre étude.

**Tableau 6** : Nombre de souches isolées dans les trois régions.

Zones de prélèvement	Nombre de souches
Boukiou P1	1
Remchi P2	6
Bordj Arima P3	5
P4	2



**Figure 15** : Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse de différentes régions.

## Chapitre V : Résultats et Discussion

---

### 2. Etudes phénotypiques des bactéries isolées à partir des nodules de la plante légumineuse *Vicia faba*. L

#### 2.1. Caractères culturaux

##### 2.1.1. Croissance sur le milieu YMB

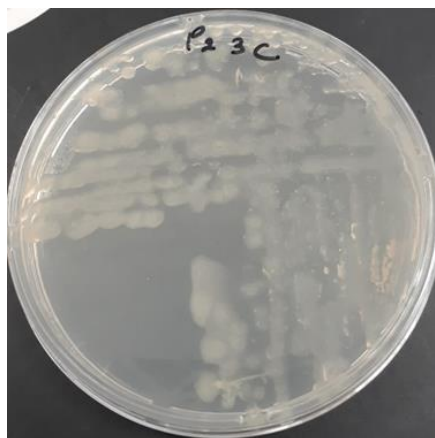
Le milieu YMB utilisé est un bouillon qui permet d'enrichir les souches sélectionnées et suspectées d'être *Rhizobium*.

Après 48 à 72 heures d'incubation, nous avons observé l'apparition d'une croissance sur le milieu YMB, se traduisant par la présence d'un trouble. Ce résultat était semblable à celui mentionné précédemment par Hewedy et *al.*, (2014) qui a affirmé la présence d'une turbidité uniforme sur le bouillon YEM.

##### 2.1.2. Croissance sur le milieu YMA

Après 3 jours d'incubation à 28°C, les résultats de la caractérisation culturelle des isolats sur le milieu YMA ont indiqué une croissance notable sur ce milieu, avec des colonies blanches crémeuses à translucides, lisses et de taille variée de 2 mm à 4 mm de diamètre avec un aspect visqueux (figure 16). Cela peut s'expliquer par le fait que les bactéries ont la capacité d'évoluer et de se multiplier sur ce milieu nutritif. Ces caractéristiques ont été définies par Garrity et *al.*, en 2005.

Selon le temps de croissance, nous avons distingué deux types de *Rhizobia* : les *Rhizobia* à croissance rapide (48 à 72h) et les *Rhizobia* à croissance lente (plus de 5 jours), ce qui a été décrit par Samasegaran et Hoben (1994).



**Figure 16** : Croissance de la souche P2.3C sur le milieu YMA.

## Chapitre V : Résultats et Discussion

---

### 2.1.3. Croissance sur le milieu YMA-RC

Nous avons réalisé plusieurs purifications sur le milieu YMA additionné de rouge Congo pour les isolats ayant un aspect homogène. Les colonies ont présenté une texture visqueuse, bombée, mucilagineuse avec une couleur légèrement rose, ce qui signifie que les isolats n'ont pas absorbé le colorant ou ils l'ont faiblement absorbé (figure 17).

Ce résultat est en concordance avec les travaux de Samasegaran et Hoben (1985), qui ont prouvé que les colonies de *Rhizobium* doivent présenter peu ou pas d'absorption du rouge Congo après une incubation de 48 à 72h à 28°C.



**Figure 17** : Croissance sur milieu YMA + RC.

### 2.1.4. Croissance sur milieu YMA contenant du bleu de Bromothymol

Ce test aide à différencier entre les deux types de *Rhizobium* selon leur vitesse de croissance :

- Les bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*).
- Les bactéries à croissance rapide (les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium*).

Les résultats obtenus après une incubation de 72h à 28°C ont montré que la plupart des isolats ont présenté une coloration jaune, due à l'acidification du milieu de culture, ce qui indique que la croissance de ses souches est rapide. Seulement une souche P2.4 a montré une coloration bleue (figure 18), donc elle est considérée comme bactérie alcalinisant à croissance lente.

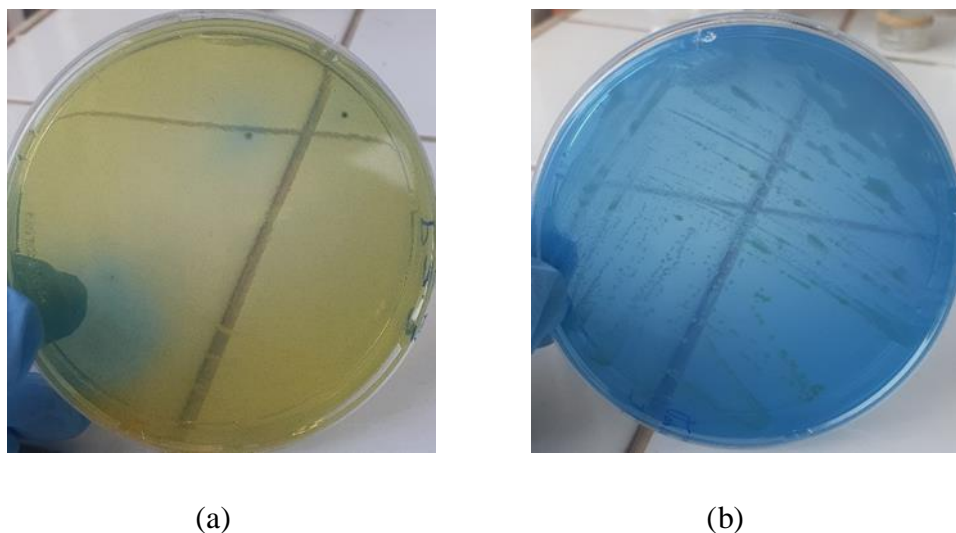


## Chapitre V : Résultats et Discussion

---

Nos résultats sont similaires à ceux de Hajjam et *al.*, (2010), qui ont affirmé que les bactéries alcalinisant le milieu sont qualifiées de croissance lente et appartiennent au genre *Bradyrhizobium*.

Par ailleurs, Li et *al.*, (2017) ont montré que le virage au jaune dans le milieu se traduit par la production d'acide par les souches de *Rhizobium*.



**Figure 18** : Croissance de souches sur milieu YMA additionné du bleu de Bromothymol.

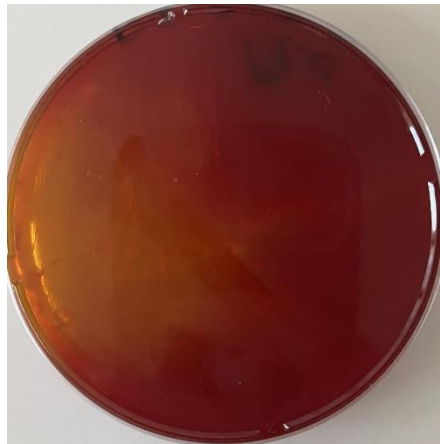
(a) La souche P1.4 ; (b) la souche P2.4.

### 2.1.5. Croissance sur milieu GPA+BCP

Aucune croissance de nos souches n'a été observée sur le milieu GPA contenant du pourpre de bromocrésol, à l'exception des souches P1.2, P3.3, P2.5 et P3.5 qui ont entraîné une faible modification de pH du milieu en donnant une couleur jaunâtre (figure 19), ce qui indique une faible croissance sur ce milieu, ceci est en accord avec les résultats signalés par Agraw en (2012).

L'absence de croissance des souches sur le milieu est une caractéristique culturelle spécifique des espèces de *Rhizobium* décrit par Somasegaran et Hoben (1994) qui affirme que le milieu (glucose-peptone-agar) ne favorise pas la croissance de *Rhizobia* mais d'autres contaminants tels que le genre *Agrobacterium*.

Benselama et *al.*, (2018) ont prouvé qu'une croissance médiocre sur le milieu GPA peut s'expliquer par le fait que les *Rhizobia* ne préfèrent pas la peptone comme source d'azote, de vitamine, de facteurs de croissance ou d'acide aminés.

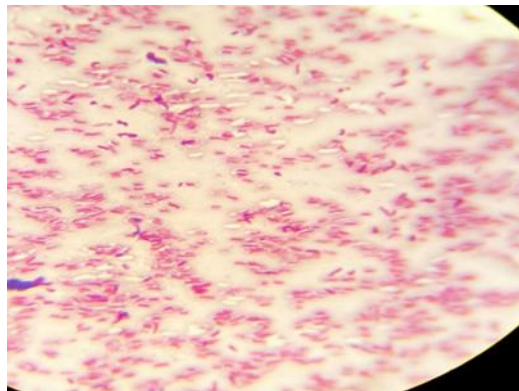


**Figure 19** : Aspect macroscopique de la croissance de la souche P1.2 sur GPA+BCP.

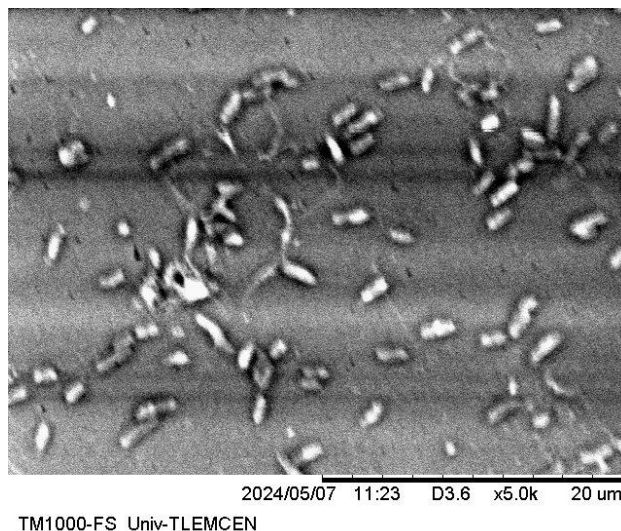
### 2.1.6. Examen microscopique

L'observation microscopique des isolats après l'examen à l'état frais (observation x40) a révélé des cellules mobiles en formes de bâtonnets, et la coloration de Gram a confirmé la présence de petites cellules présentant une forme de bacilles à extrémités arrondies, bâtonnets à Gram négatif (figure 20 et 21).

Ces caractéristiques morphologiques observées correspondent à celle décrites pour les *Rhizobia* (Hussein et *al.*, 2016).



**Figure 20** : Observation microscopique de souches au microscope optique (Grossissement X40).



**Figure 21** : Observation microscopique des souches au microscope électronique à balayage (Grossissement X 10000)

### 3. Caractères biochimiques

#### 3.1. Test de la catalase

Les résultats obtenus lors de la mise en contact avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ont été positifs pour toutes les souches testées, indiquée par un dégagement de bulles d'air autour des colonies bactériennes (figure 22), ce qui confirme la présence de l'enzyme (catalase+) qui est l'un des caractères biochimiques des Rhizobia.

Ces résultats concordent fortement avec ceux trouvés par Paudyal et *al.*, (2021).



**Figure 22** : Résultat du test de catalase.

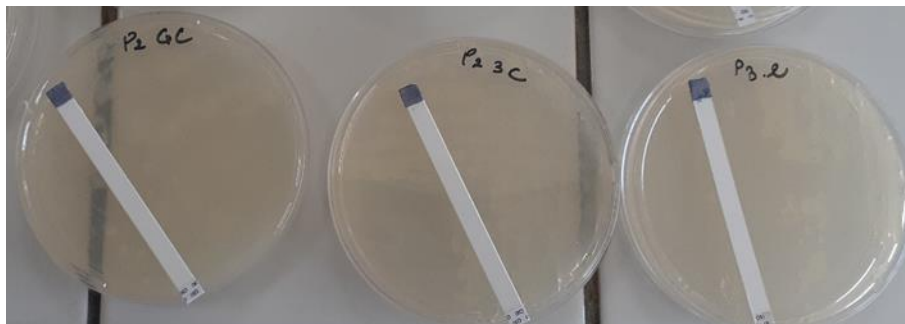
#### 3.2. Test d'oxydase

Toutes les souches étudiées présentaient une activité oxydase positive après avoir observé une teinte bleu foncé immédiate sur la bandelette (figure 23), ce qui suggère qu'elles possèdent cette enzyme.

## Chapitre V : Résultats et Discussion

---

Une étude effectuée par Tian et *al.*, en (2008) sur des *Rhizobia* nodulant la fève a présenté des résultats semblables aux nôtres.



**Figure 23** : Résultats du test d'oxydase.

### 3.3. Test du citrate de Simmons

Les souches provenant des nodules de l'espèce *Vicia faba*. L ont révélé un test de citrate négatif, ce qui signifie que ces bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone.

L'étude présentée par Tamam et Alebejo (2017) a montré le même résultat.

Nos résultats concordant également avec ce que Belay et Assefa (2011) ont découvert dans leur recherche sur la diversité symbiotique et phénotypique de la bactérie *Rhizobium léguminosarum* isolée des sols Éthiopiens.

### 3.4. Test du nitrate réductase

Les résultats obtenus après la 1ère étape de la lecture ; ça veut dire après avoir ajouté les réactifs Nit 1 et Nit 2 ont révélé l'apparition d'une coloration rose pour la souche P3.3, ce qui signifie qu'elle possède l'enzyme nitrate réductase (NR+), ainsi qu'elle a réduit les nitrates en nitrites tandis que les autres sont restées incolores (figure 24). Ce qui nous a permis de passer à l'étape d'ajout de la poudre de zinc pour confirmer la présence ou l'absence de l'enzyme. Les souches testées n'avaient montré aucun changement de couleur, cela indique la présence de l'enzyme nitrate réductase chez ces isolats (figure 24).

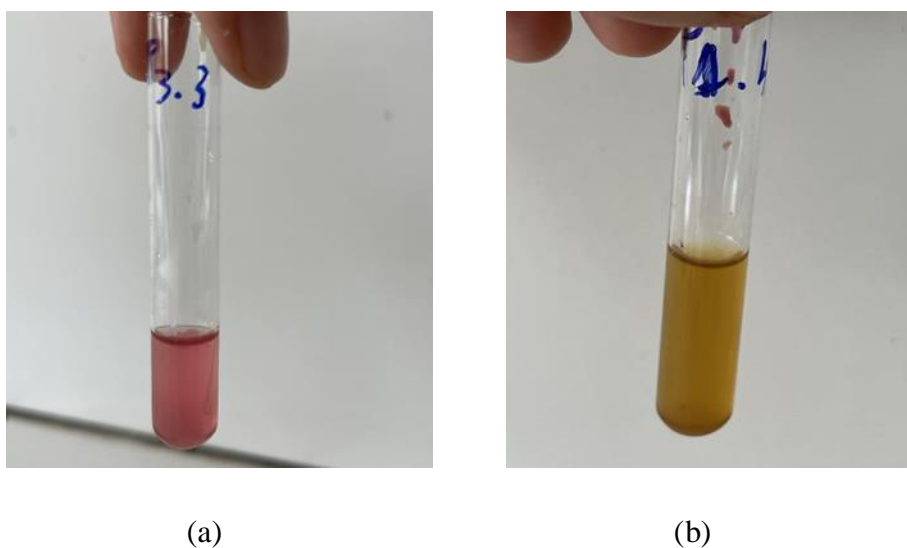
Ces résultats suggèrent que les souches étudiées sont des espèces de *Rhizobium*.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus par Tian et *al.*, (2008), nous avons constaté une différence notable révélant l'absence totale de l'enzyme nitrate réductase chez les souches isolées à partir des nodules racinaires de la même espèce étudiée.

## Chapitre V : Résultats et Discussion

Tandis que, la recherche réalisée en 2006 par Deka et Azad a rapporté la présence de l'activité réductrice de nitrate chez certaines souches de *Rhizobium*.

De nombreuses études ont documenté l'effet négatif du nitrate sur la nodulation induite par les Rhizobia. En effet, l'abondance de nitrate dans le sol inhibe complètement ou réduit considérablement l'efficacité de l'infection des légumineuses par des *Rhizobia* ayant une activité de nitrate réductase (Lucinski et *al.*, 2002). Donc la capacité à réduire les nitrates chez les souches de *Rhizobium* est une caractéristique écologique significative.



**Figure 24** : Résultat du test de la Nitrate-réductase.

(a) Résultats avant l'ajout du Zinc en poudre, (b) Résultats après ajout de poudre de zinc.

**Tableau 7** : Résultats des tests biochimiques.

Test Souches	Catalase	Oxydase	Citrate	Nitrate réductase
P1.4	+	+	-	+
P2.GC	+	+	-	+
P2.1GC	+	+	-	+
P2.3A	+	+	-	+
P2C3	+	+	-	+
P2.3(C)	+	+	-	+

## Chapitre V : Résultats et Discussion

<b>P2.4</b>	+	+	-	+
<b>P3.2</b>	+	+	-	+
<b>P3.2 (A)</b>	+	+	-	+
<b>P3.2 (B)</b>	+	+	-	+
<b>P3.3</b>	+	+	-	+
<b>P3.3'</b>	+	+	-	+
<b>P4.3</b>	+	+	-	+
<b>P4.5</b>	+	+	-	+

+ Résultat positif ; - Résultat négatif

### 4. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats obtenus ont montré que nos isolats présentaient des variations dans leur résistance à différents antibiotiques, ils sont consignés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : Résultats de l'antibiogramme pour les souches testées.

	<b>P1.4</b>	<b>P2.1</b>	<b>P2.3C</b>	<b>P2.4</b>	<b>P3.2 (B)</b>	<b>P3.3</b>	<b>P4.5</b>
<b>AMC</b>	S	S	S	R	S	S	S
<b>CRO</b>	S	S	S	R	S	S	S
<b>KF</b>	R	S	R	R	R	R	R
<b>PRL</b>	R	S	S	S	S	S	R
<b>TGC</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>F</b>	S	S	S	R	S	S	R
<b>TEL</b>	S	S	S	R	S	S	S
<b>CPT</b>	R	S	S	R	S	R	S
<b>N</b>	S	S	S	S	S	S	R
<b>MY</b>	R	R	R	R	S	R	S
<b>SPC</b>	R	S	S	S	S	S	S
<b>NOR</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>MTZ</b>	R	R	R	R	R	R	R
<b>TM</b>	R	S	S	R	S	R	R

AMC = Amoxicilline ; CRO = Céftriaxone ; KF = Céfalotine ; PRL = Pipéracilline ; TGC = Tigécycline ; F = Nitrofurantoïne ; TEL = Télithromycine ; CPT=Céftazoline ; N =

## Chapitre V : Résultats et Discussion

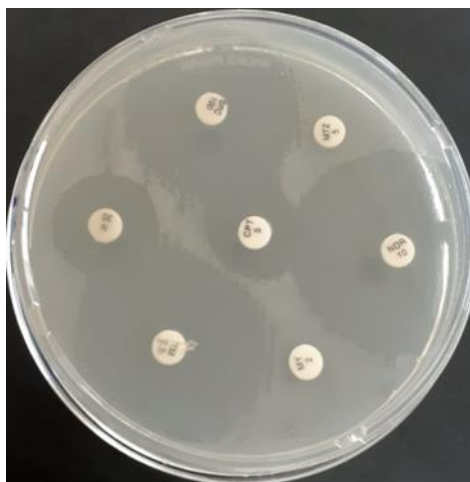
---

Néomycine ; MY = Lincomycine ; SPC= Spectinomycine ; NOR = Norfloxacine ; MTZ = Métronidazole ; TM = Triméthoprim ; S = sensible ; R = résistant.

Presque toutes les souches ont été sensibles à l'amoxicilline, au céftriaxone et à la télithromycine, à l'exception de la souche P2.4 qui résiste à ces molécules et la souche P2.1 qui résiste au métronidazole et à la lincomycine.

Les isolats présentaient généralement un profil de sensibilité aux antibiotiques comparable à celui des autres isolats de *Rhizobium* en ce qui concerne l'amoxicilline et la céftriaxone (Elbanna et *al.*, 2009).

La figure (25) représente les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques, indiquant l'apparition de zones d'inhibition autour de la majorité des disques d'antibiotiques.



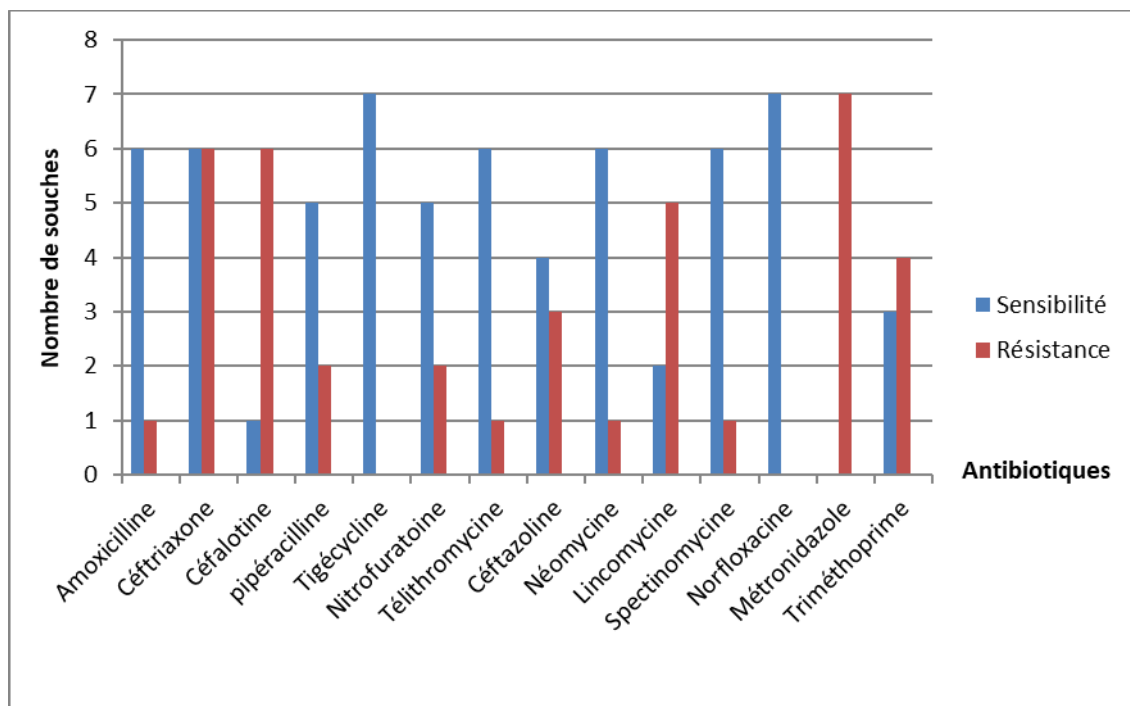
**Figure 25** : Résultat de l'antibiogramme de la souche P2.1.

La figure (26) montre que la totalité des souches présentaient une forte sensibilité à la norfloxacine et tigécycline mais elles résistent au métronidazole. Une sensibilité significative a été observée envers la spectinomycine et la néomycine.

Ces résultats sont quasiment similaires à ceux obtenus par Hassan et *al.*, (2015) qui a trouvé une forte sensibilité la néomycine et norfloxacine chez des souches isolées en Égypte.

La sensibilité à la spectinomycine enregistrée dans ce travail reste relativement similaire à celle rapportée par Zhang et *al.*, (1991).

## Chapitre V : Résultats et Discussion



**Figure 26** : Résultats de la sensibilité des isolats aux différents antibiotiques.

Dans cette étude, la majorité des isolats testés ont montré une forte résistance à la céfalotine. Ceci est dû à la présence de différentes pompes d'efflux favorisant l'élimination des antibiotiques hors de la cellule, aussi par modification de la cible et par diminution de la perméabilité cellulaire (Cattoir, 2004).

Les bactéries à gram négatif y compris les *Rhizobia* sont capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines comme la céfalotine par production des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de type AmpC, qui sont responsables de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Poirel et Nordmann, 2006).

Certains isolats ont été sensibles à la pipéracilline appartenant à la famille de  $\beta$ -lactamines mais également à la céftazoline et nitrofurantoïne. Par contre, la lincomycine et le triméthoprim ont présenté une faible activité vis-à-vis de nos souches, ces fortes résistances avaient déjà été prouvées dans une recherche similaire au Soudan (Zhang *et al.*, 1991).

La résistance développée au Triméthoprim par certaines souches de *Rhizobium* peut s'exprimer par l'effet des pompes à efflux mais surtout par une modification du site cible (dihydrofolate réductase) de l'antibiotique par mutation chromosomique (Naamala *et al.*, 2016).



# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

---

### Conclusion

Les *Rhizobia* sont des bactéries bénéfiques qui forment une symbiose avec les plantes légumineuses comme les fèves. Ces bactéries colonisent les racines des plantes et forment des nodosités où elles fixent l'azote atmosphérique, aidant ainsi la plante à se développer. En Algérie, il est intéressant d'étudier les souches des *Rhizobia* qui nodulent les fèves dans le sol, car cela peut avoir un impact positif sur la production agricole.

Dans notre étude, nous avons analysé des souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires de la plante légumineuse *Vicia faba*. L, collectée dans trois régions de la wilaya de Tlemcen, située dans l'Ouest algérien.

Selon les résultats de l'antibiogramme, nous avons constaté des variations dans la sensibilité aux antibiotiques chez les souches étudiées. En effet, la presque totalité des souches étaient sensibles à l'amoxicilline, céftriaxone et télichromycine.

Une forte sensibilité a été observée à la norfloxacine, tigécycline, spectinomycine et néomycine, mais une résistance au métronidazole et céfalotine a été notée, ce qui peut être dû à une inactivation enzymatique et à l'effet des pompes à efflux. Certaines souches étaient sensibles à la pipéracilline, céftazoline et nitrofurantoïne, mais résistantes à la lincomycine et triméthoprim, en raison de modifications chromosomiques.

Considérant les points abordés ci-dessus, nous pouvons conclure que les caractéristiques morphologiques et phénotypiques étudiées sur des souches nodulant la plante *Vicia faba*. L correspondent fortement à celle de *Rhizobia*. Cependant, cette hypothèse ne peut être confirmée qu'après une distinction appréciable par des études phénotypiques complémentaires notamment les tests nutritionnels et enzymatiques, les tests symbiotiques comme le test de nodulation, la caractérisation moléculaire et génotypique des isolats, ainsi que l'étude de leur résistance aux métaux lourds. Il est également souhaitable d'étudier la compétitivité de *Rhizobium* vis-à-vis d'autres microorganismes du sol.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques

-A-

Abda Kamila, R. W. G. S. (2010). Détermination des profils protéiques d'une bactérie isolée à partir des nodules d'une plante légumineuse du genre *Hedysarum*.

Alekshun, M. N. et Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.

Argaw, A. (2012). Characterization of symbiotic effectiveness of rhizobia nodulating *Faba* bean (*Vicia faba* L.) isolated from central Ethiopia. *Research Journal of microbiology*, 7(6), 280-296.

-B-

Baba Arbi, S. (2016). Étude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla) (Doctoral dissertation, Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat microbiologie appliquée, université badjimokhtar–Annaba). Repéré à <https://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2016/11/These-Baba-Arbi-Souad.pdf>.

Baljinder Singh, B. S., Ravne et Kaur, R. K., & Kashmir Singh, K. S. (2008). Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek).

Barton, L., McLay, C. D. A., Schipper, L. A., & Smith, C. T. (1999). Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. *Australian Journal of Soil Research*, 37(6), 1073. doi :10.1071/sr99009.

Benahmed, A. (2010). Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium*. Mémoire de Magister.

Benidire, L., Lahrouni, M., Daoui, K., Fatemi, Z. el A., Gomez Carmona, R., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2018). Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(1), 51–61. doi: 10.1016/j.syapm.2017.09.003.

## Références bibliographiques

---

Benselama A., Tellah S., Ourem F. et Ounane S. M. (2018). Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria. *Legume Research-An International Journal*, 41(4), 624-628.

Beraud. (2007). Etude des effets écotoxiques et de l'induction des phytochélatines chez *Vicia faba* L. (Fabaceae) exposée au cadmium. Application de test *Vicia* –micronoyaux à des matrices. Thèse de doctorat. Université de Mets, p 107.

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

Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... et Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), 173-183.

Bouzraïb, H., Bouziane, H. (2016). Contribution à l'étude des certaines activités enzymatiques et l'effet du PH chez les bactéries nodulant les légumineuses du genre *Phaseolus*.

-C-

Cerri, M. R., Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., ...Parniske, M. (2017). The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, 215(1), 323-337.

Chabbi, R. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie. p.126.

Clardy, J., Fischbach, M. A. et Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current biology*, 19(11), R437-R441.

Cleland, E. E., & Harpole, W. S. (2010). Nitrogen enrichment and plant communities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), 46-61.

Cooper, J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1355-1365.

## Références bibliographiques

---

-D-

Daoui, K. (2007). Recherche de stratégies d'amélioration de l'efficacité d'utilisation du phosphore chez la fève (*Vicia faba* L.) dans les conditions d'agriculture pluviale au Maroc. Mémoire de thèse, 156-201.

Datta, N., Hedges, R. W. (1972). Trimethoprim resistance conferred by W plasmids in Enterobacteriaceae. *Microbiology*, 72(2), 349-355.

Daubech, B. (2019). Évolution expérimentale d'un symbiote de légumineuse : étude des facteurs génétiques et des forces de sélection qui favorisent ou non l'évolution du mutualisme (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).

Davet, P. (1996). Vie microbienne de sol et production végétale. Paris : Institut National de la recherche agronomique.

Deka, A. K. et Azad, P. (2006). Isolation of rhizobium strains: cultural and biochemical characteristics. *Legume Research-An International Journal*, 29(3), 209-212.

Dénarié, J., Debellé, F. et Promé, J.-C. (1996). Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 503–535. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.002443

Diedhiou, I., Diedhiou, A. G. et Diouf, D. (2022). Les symbioses fixatrices d'azote : types et régulateurs transcriptionnels de la nodulation. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 16(2), 695-712.

Doi, Y., Wachino, J. I. et Arakawa, Y. (2008). Nomenclature of plasmid-mediated 16S rRNA methylases responsible for panaminoglycoside resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(6), 2287-2288.

Domergue, O. (2017). Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France (Doctoral dissertation, Université Paris sciences et lettres).

Dowling, A., O'Dwyer, J., Adley, C. (2017). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrobialresearch: Novel bioknowledge and educational programs*, 1, 536-545

## Références bibliographiques

---

Dramane, C. (2022). Prescription des antibiotiques dans le service d'accueil des urgences du CHU Gabriel Touré (Thèse de doctorat, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies, Bamako). Repéré à <https://www.bibliosante.ml/handle/123456789/5707>.

Dreyfus, B. (1982). Rhizobium ET Sesbania rostrata (Doctoral dissertation, UNIVERSITE PARIS).

Drlica, K., Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(3), 377-392.

Duc, G. 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*. 53: 99-109.

Duhoux, É. et Nicole, M. (2004). *Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes*. Paris : Dunod.

-F-

Farida, K., & Zohra, M. F. (2010). Caractérisations phénotypiques de rhizobianodulant *Cicer arietinum*. L (Pois chiche).

Fitouri, S. D. (2011). Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du *Sulla* du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces (Doctoral dissertation, PhD dissertation).

Fossou, K. R. (2019). Etude du système symbiotique rhizobia-Cajanuscajan dans des champs cultivés en Côte d'Ivoire (Doctoral dissertation, éditeur non identifié).

Franche C, Lindström K. et Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321: 35–59.

-G -

Garrity, G. M. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria (Part C)*. D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (Eds.). Springer US.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-574). Springer, Boston, MA.

## Références bibliographiques

---

Gharzouli, Razika. (2006). Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. Mémoire de Magister en Génétique Moléculaire. Université Mentouri.

Giraud, E. (2007). Symbiose rhizobium/ légumineuse : un nouveau sésame. *Médecine/sciences*, 23(6-7), 663–666. doi :10.1051/medsci/20072367663.

Gerrits, M. M., de Zoete, M. R., Arents, N. L., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. (2002). 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(9), 2996-3000.

-H-

Hadri, A. E., Spaink, H. P., Bisseling, T., & Brewin, N. J. (1998). Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In *The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria* (pp. 347-360). Dordrecht: Springer Netherlands.

Hajjam, Y., Alami, I. T., Udupa, S. M., & Cherkaoui, S. (2016). Isolation and evaluation of phosphate solubilizing rhizobia from root nodules of faba bean (*Vicia faba* L.) in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(11), 4000-4010.

Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1081–1084. doi:10.1093/jn/130.5.1081.

Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. et Slack, A. (2004). Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*, 12(9), 401-404.

Hayatsu, M., Tago, K. et Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33-45.

Hewedy, O. A., Eissa, R. A., Elzanaty, A. M., Nagaty, H. H. et Abd Elbary, M. I. (2014). Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia nodulating Faba bean from various Egyptian locations. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(5), 1.

Hopkins, William G. 2003. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. P 99-112.



## Références bibliographiques

---

Hussein, M. H., Zaghoul, R. A., Abou Aly, H. A., Abdel-Rahman, H. M. et Abotaleb, H. H. (2016). Isolation and identification of rhizobial strains from faba bean nodules. *Annals of Agric. Sci*, 54(3), 591-600.

-J-

Joffin JN, Leyral G. (2001). *Microbiologie technique : 1 'Dictionnaire des techniques'*. 3ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine,; 320 p.

-K-

Kaufman, G. (2011). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Nursing Standard*, 25(42), 49–55. doi :10.7748/ns.25.42.49. s52.

Krimi, S., Felouat, R., Bouhlaies, A. (2021). Symbiose Rhizobium-légumineuse et diversité des rhizobia nodulant les légumineuses de la tribu des Viciae.

Kuykendall, L. D., Young, J. M., Martínez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2015). Rhizobium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-36.

-L -

Lancini, G. et Parenti, F. (2013). *Antibiotics: an integrated view*. Springer Science & Business Media.

Legume Phylogeny Working Group, Bruneau, A., Doyle, J. J., Herendeen, P., Hughes, C., Kenicer, G., ... & van Wyk, B. E. (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), 217-248.

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

Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Rico, L. et Clark, R. (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context—a tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, 89, 76-84.

Lewis, O. A. et Lewis, O. A. (1986). *Plants and nitrogen* (No. 166). Cambridge University Press.

## Références bibliographiques

---

Li, P., Teng, C., Zhang, J., Liu, Y., Wu, X. et He, T. (2023). Characterization of drought stress-mitigating Rhizobium from faba bean (*Vicia faba* L.) in the Chinese Qinghai-Tibet Plateau. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1212996.

Li, Z. et Velkov, T. (2019). Polymyxins: Mode of Action. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, 37–54. doi:10.1007/978-3-030-16373-0\_4.

López-Bellido, F. J., López-Bellido, L. et López-Bellido, R. J. (2005). Competition, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.). *European Journal of Agronomy*, 23(4), 359–378.

Lucinski R., Polcyn W., Rotayczak L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen in symbiotic association Rhizobium - legumes. *Acta. BiochimiaPolonia*, 49 (2): 537 – 546.

-M-

Ma, W., Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2002). Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Canadian journal of microbiology*, 48(11), 947-954.

Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 250–258. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.003.

Machefert, S. E., Dise, N. B., Goulding, K. W. T., & Whitehead, P. G. (2002). Nitrous oxide emission from a range of land uses across Europe. *Hydrology and Earth System Sciences*, 6(3), 325-338.

Mahboub, A. (2018). Contribution à l'étude de l'interaction microbienne avec les plantes légumineuses.

Maiden, M. C. (1998). Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(Supplement\_1), S12-S20.

Maroc, M., Tolosan Cedex, F. (2014). Original Research Article Effects of Selected Endophyte Actinomycete on Growth, Nodulation, Nitrogen Fixation and Yield for three leguminous. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(10), 733-742.

Maxted, N., & Bennett, S. J. (Eds.). (2001). *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean* (Vol. 39). Springer Science & Business Media.

Mc Dermott, P. F., Walker, R. D., & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International journal of toxicology*, 22(2), 135-143.

## Références bibliographiques

---

Memento De L'Agronome .2006. CIRAD, nouvelle Édition, France.

Menadi, O. boumaza, A. (2016). Analyse du microsymbiote isolé à partir des racines de la légumineuse *Trigonellagradiata* Stev. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Mezani, S. (2011). Bioécologies de la fève *Bruchusrufimanus* boh. (coleoptera:bruchidae) dans les parcelles de variétés de fève différentes et de féverole dans la région de tizi-rached.

Morot-Gaudry, J. F. (1997). Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologiques, biochimique et moléculaire.

Morot-Gaudry, J. F., Maurel, C., Moreau, F., Prat, R. et Sentenac, H. (2017). Biologie végétale: Nutrition et métabolisme (3e éd). Paris : Dunod.

Morot-Gaudry, J.F. (2017). Biologie végétale Nutrition et métabolisme (3e éd). Paris : Dunod.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. et Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950.

-N-

Naamala, J., Jaiswal, S. K. et Dakora, F. D. (2016). Antibiotics resistance in *Rhizobium*: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Current microbiology*, 72, 804-816.

Naidji, M. et Benguedouad, I. (2020). Les bactéries rhizosphériques : Méthodes d'isolement, d'identification et d'étude de leurs activités enzymatiques (Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arreridj). Repéré à <https://dspace.univ-bba.dz/xmlui/handle/123456789/362>.

Neyra, M. (1992). Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote légumineuse/*Rhizobium*. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.

Nouar, M., Riabi, K. (2014). Isolement et caractérisation des bactéries nodulants la légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans deux sites différents. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

-O-

## Références bibliographiques

---

Ouslim, S., Merabet, C., Boukhatem, Z., Bouchentouf, L. et Bekki, A. (2015). Phenotypic and symbiotic diversity, of nodulating rhizobia associated with bean (*Vicia faba*) in West Algeria. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 3(9), 130-138.

-P-

Palai, J. B., Malik, G. C., Maitra, S. et Banerjee, M. (2021). Role of Rhizobium on growth and development of groundnut: a review.

Pao, S. S., Paulsen, I. T. et Saier, M. H. (1998). Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 1–34. doi:10.1128/membr.62.1.1-34.1998.

Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier, M. H., Turner, R. J., Weiner, J. H., ... Grinius, L. L. (1996). The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology*, 19(6), 1167–1175. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02462.x.

Peach, K. C., Bray, W. M., Winslow, D., Linington, P. F. et Linington, R. G. (2013). Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis. *Molecular BioSystems*, 9(7), 1837. Doi:10.1039/c3mb70027e.

Pesson, P. (1984). Pollinisation et productions végétales. Editions Quae.

PIERRE, J., SUSO, M. J., MORENO, M. T., ESNAULT, R., & LE GUEN, J. (1999). Diversité et efficacité de l'entomofaune pollinisatrice (Hymenoptera: Apidae) de la fève (*Vicia fabae* L.) sur deux sites, en France et en Espagne. In *ANNALES-SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE DE FRANCE* (Vol. 35, pp. 312-318). ANNALES DE LA SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE DE FRANCE.

Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woelverton, C. J. (2018). Microbiologie. De Boeck Supérieur.

Pujic, P., Normand, P., (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*, (298), 26-29.

## Références bibliographiques

---

-R-

Rajasundari, K., Ilamurugu, K. et Logeshwaran, P. (2009). Genetic diversity in rhizobial isolates determined by RAPDs. *African Journal of Biotechnology*, 8(12)

Recous, S., Nicolardot, B. et Simon, J. C. Le cycle d'azote dans les sols et la qualité des eaux.

Rfaki, A., Nassiri, L. et Ibijbijen, J. (2015). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean (*Vicia faba* L.) in Meknes region, Morocco.

Roche, P., Maillet, F., Plaz Janet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., ... Denarie, J. (1996). The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15305–15310. doi:10.1073/pnas.93.26.15305.

Roger, P.A., Dommergues, Y., Balandreau, J., Dreyfus, B. et Sougoufara, B. (1996). La fixation biologique de l'azote. Paris : Conférence-débat de l'ORSTOM.

RouabhiAhlemSlatniaSoumia, T. B. (2018). Etude symbiotique des bactéries du sol.

-S-

Saier, M. H., Tam, R., Reizer, A. et Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular Microbiology*, 11(5), 841–847. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00362.x.

Sass, P. (2016). Antibiotics: Precious Goods in Changing Times. *Antibiotics*, 3–22. Doi:10.1007/978-1-4939-6634-9\_1

Scheiner J.D., 2005. Spéciation du Carbone, de l'Azote et du Phosphore de différentes boues de stations d'épuration au cours de leurs incubations contrôlées dans deux types de sol. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Schneider, A. et Huyghe, C. (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables (p. 512). Éditions Quae.

Sebihi F., 2008. Les Bactéries Nodulantes les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine, Algérie.

## Références bibliographiques

---

Sillero, J. C., Villegas-Fernández, A. M., Thomas, J., Rojas-Molina, M. M., Emeran, A. A., Fernández-Aparicio, M., & Rubiales, D. (2010). Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research*, 115(3), 297-307.

SOBTI, S. (2013). Isolement des bactéries telluriques résistantes aux effets de salinité (Doctoral dissertation).

Somasegaran P, Hoben H G (1985) *Methods in Legume Rhizobium Technology*. United States Agency for International Development (USAID).

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Collecting nodules and isolating rhizobia. *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*, 7-23.

Sprent, J. I. (1987). *The ecology of the nitrogen cycle*. New York: Cambridge University Press.

Storm, D. R., Rosenthal, K. S. et Swanson, P. E. (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annualreview of biochemistry*, 46(1), 723-763.

Suty, L. (2015). *Les végétaux : des symbioses pour mieux vivre*. France : QUAE. p: 20, 22.

-T-

Tang, C. (2013). Biography of Professor Martinus Willem Beijerinck. *Journal of Applied Virology*, 2(3), 4-5.

Temam, A.H., Alebejo, A.L., (2017) Isolation and Characterization of Rhizobia from Rhizospher and Root Nodule of Cowpea, Elephant and Lab Lab Plants *International Journal of Novel Research in Interdisciplinary Studies* Vol. 4, Issue 4, pp: (1-7), Available at: [www.noveltyjournals.com](http://www.noveltyjournals.com).

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011.

Todar, K. (2004). *Todar's online textbook of bacteriology*.

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulants les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.

## Références bibliographiques

---

-V-

Valé M., 2006. Quantification et prédiction de la minéralisation nette de l'azote du sol in situ, sous divers pédoclimats et systèmes de culture français, Thèse de Doctorat N° 2367, INRA-France.

Vernié, T. (2008). Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., ... & Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.

-W-

Waksman SA. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* 39:565–569.

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775-781.

Wilson, M. E. (2019). *Antibiotics: What Everyone Needs to Know®*. United States of America: Oxford University Press.

Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.

Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175–186. doi:10.1038/nrmicro1614.

-Z-

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

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M., ... et De Lajudie, P. (2004). Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and applied microbiology*, 27(3), 380-395.

## Références bibliographiques

---

Zipfel, C., Oldroyd, G. E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543(7645), 328-336.

### Sites web

[1] <https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinares.html>

[2] <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/5404/bacteroide> consulté le 25 février 2024.

[3] <https://biology.anu.edu.au/news-events/news/nodulation-legumes>

[4] <https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Tlemcen--Remchi--Beni-Ouarsous>

[5] <https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Tlemcen--Remchi--Remchi>

[6] <https://journals.openedition.org/geomorphologie/1318>

[7] [https://fr.getamap.net/cartes/algeria/algeria\\_\(general\)/\\_beniouarsous\\_commune/](https://fr.getamap.net/cartes/algeria/algeria_(general)/_beniouarsous_commune/)



### Annexes

#### Annexe 1:

##### Composition du milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol 10.0g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g

NaCl 0.1g

Extrait de levure 0.5g

Eau distillée 1000ml

PH 6.8

Autoclavage 120° Pendant 20minutes

##### Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol 10.0g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g

NaCl 0.1g

Extrait de levure 0.5g

Agar 18g

Eau distillée 1000ml

PH 6.8

Autoclavage 120°C Pendant 20minutes

## **Annexes**

---

### **Composition du milieu YMA + rouge Congo**

YMA 1000ml

Solution stock de rouge Congo 10ml

PH 6.8

Autoclavage 120°C Pendant 20minutes

- **Solution stock de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée)**

### **Composition du YMA + bleu de bromothymol**

YMB 1000ml

Solution stock de bleu de bromothymol 5ml

Agar 18g

PH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

- **Solution stock de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100m d'éthanol)**

### **Composition du milieu Glucose Peptone Agar (GPA) + pourpre de bromocrésol (BCP)**

Glucose 10g

Peptone 5g

Solution stock de bromocrésol 10ml

Eau distillée 1000ml

Agar 18g

PH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

## Annexes

---

- **Solution stock de bromocrésol** : Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g de BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

## Annexes

### Annexe 2 :

**Tableau :** Classe d'antibiotiques et leur propriétés (Todar, 2004).

Chemical class	Examples	Biological Source	Spectrum (effective against)	Mode of action
Beta-lactams (penicillins and cephalosporins)	Penicillin G, Cephalothin	Penicillium notatum and Cephalosporium Species	Gram-positive bacteria	Inhibits steps in cell wall (peptidoglycan) synthesis and murein assembly
Semisynthetic Penicillin	Ampicillin, Amoxicillin		Gram-positive and Gram-negative bacteria	Inhibits steps in cell wall (peptidoglycan) synthesis and murein assembly
Clavulanic Acid	Clavamox is clavulanic acid plus amoxicillin	Streptomyces Clavuligerus	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Suicide inhibitor of beta-lactamases
Monobactams	Aztreonam	Chromobacter Violaceum	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Inhibits steps in cell wall (peptidoglycan) synthesis and murein assembly
Carboxypenems	Imipenem	Streptomyces Cattleya	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Inhibits steps in cell wall (peptidoglycan) synthesis and murein assembly
Aminoglycosides	Streptomycin	Streptomyces Griseus	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Inhibit translation (protein synthesis)
	Gentamicin	Micromonospora Species	Gram-positive and Gram-negative bacteria esp. Pseudomonas	Inhibit translation (protein synthesis)

## Annexes

Glycopeptides	Vancomycin	Streptomyces Orientales	Gram-positive bacteria, esp. Staphylococcus aureus	Inhibits steps in murein (peptidoglycan) biosynthesis and assembly
Lincomycins	Clindamycin	Streptomyces Lincolnensis	Gram-positive and Gram-negative bacteria esp. anaerobic Bacteroides	Inhibits translation (protein synthesis)
Macrolides	Erythromycin	Streptomyces Erythreus	Gram-positive bacteria, Gramnegative bacteria not enterics, Neisseria, Legionella, Mycoplasma	Inhibits translation (proteinsynthe sis)
Polypeptides	Polymyxin	Bacillus Polymyxa	Gram-negative bacteria	Damages cytoplasmic membranes
	Bacitracin	Bacillus subtilis	Gram-positive bacteria	Inhibits steps in murein (peptidoglycan ) biosynthesis and assembly
Polyenes	Amphotericin	Streptomyces Nodosus	Fungi	Inactivate membranes containing sterols
	Nystatin	Streptomyces Noursei	Fungi (Candida)	Inactivate membranes containing sterols
Rifamycins	Rifampicin	Streptomyces Mediterranei	Gram-positive and Gram-negative bacteria, Mycobacteriu m tuberculosis	Inhibits transcription (eubacterial RNA polymerase)
Tetracyclines	Tetracycline	Streptomyces Species	Gram-positive and Gram-negative bacteria, Rickettsias	Inhibit translation (protein synthesis)