



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Département : Botanique

القسم: علم النبات

Spécialité : Interaction plantes-pathogènes et Protection
des plantes

التخصص: تفاعل النباتات – ممرضات
النباتات وحماية النبات

Mémoire De Fin D'études

Pour L'obtention Du Diplôme De Master

THÈME

**Caractérisation des bactéries bénéfiques et pathogènes associées-
au système racinaire du trèfle cultivé en association avec une
variété de blé dur et essais de biocontrôle *in vitro*.**

Présenté par : Mlle. NOUGAL Sarra Mimouna

Soutenu publiquement le : 13/07/2025

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme. BOURAGHDA H.	Professeur (ENSA)
Promotrice :	Mme. KHENFOUS-DJEBARI B.	MCB (ENSA)
Examinatrice :	Mme LAALA S.	MCA (ENSA)
Invitée :	M. TOUAMI F.	(OAIC)

Promotion : 2020/2025

TABLE DE MATIERE

Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Introduction	1
1. Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	4
1.1. Les légumineuses	4
1.1.1. Généralités sur les légumineuses	4
1.1.2. Taxonomie et origine des légumineuses.....	4
1.1.3. Description botanique des légumineuses.....	4
1.1.4. Importance agro-économique des légumineuses	4
1.1.5. L'intérêt des légumineuses	5
1.1.6. Exigences culturales des légumineuses	5
1.1.7. Catégories des légumineuses	5
1.2. Le trèfle.....	6
1.2.1. Classification botanique	6
1.2.2. Caractéristiques botaniques du trèfle	6
1.2.3. Stades de développement du trèfle.....	6
1.2.4. Les principales variétés de trèfle.....	7
1.2.4.1. Trèfle d'Alexandrie	7
1.2.4.2. Trèfle incarnat (<i>Trifolium incarnatum</i> L.).....	8
1.2.4.3. Trèfle blanc (<i>Trifolium repens</i> L.)	8
1.2.4.4. Trèfle de Perse (<i>Trifolium resupinatum</i> L.).....	9
1.2.4.5. Trèfle rouge (<i>Trifolium pratense</i> L.).....	10
1.2.5. Les principales maladies du trèfle.....	10
1.2.5.1. Maladies abiotiques.....	10
1.2.5.2. Maladies biotiques	11
1.3. Maladies bactériennes du trèfle.....	13
1.3.1. <i>Pseudomonas viridiflava</i>	13
1.3.2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>trifolii</i>	14
1.3.3. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	14
1.3.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	15

1.4.	Rhizobia	16
1.4.1.	Généralités	16
1.4.2.	Taxonomie des <i>rhizobia</i>	16
1.4.3.	Les caractéristiques des <i>Rhizobia</i>	17
1.4.4.	Interaction Rhizobium légumineuses	18
1.4.5.	Processus de nodulation.....	18
1.4.6.	Les PGPR comme biofertilisants	19
1.4.6.1.	Mécanismes directs	20
1.4.6.2.	Mécanismes moléculaires de la fixation du N ₂	20
1.4.7.	Types de biofertilisants rhizobactériens	20
1.4.7.1.	Biofertilisants fixateurs d'azote	20
1.4.7.2.	Biofertilisants solubilisant le phosphore et le potassium	20
1.4.7.3.	Biofertilisants solubilisant le zinc	21
1.4.7.4.	Biofertilisants séquestrant le fer.....	21
1.4.7.5.	Phytostimulateurs.....	21
1.4.8.	Mode d'application des biofertilisants	21
1.4.8.1.	Traitement des semences	21
1.4.8.2.	Traitement des sols.....	21
1.4.8.3.	Autres méthodes.....	22
2.	Chapitre II : Matériel et méthodes	24
2.1.	Microparcelles expérimentales	24
2.1.1.	Origine des semences	25
2.1.2.	Semis et densité de plantation.....	25
2.1.3.	Fertilisation de fond (phospho-potassique)	26
2.1.4.	Fertilisation azotée	26
2.2.	Dénombrement des épis.....	26
2.3.	Dénombrement des nodules racinaires	27
2.4.	Analyse du microbiote bactérien racinaire	27
2.4.1.	Traitement des échantillons collectés.....	27
2.4.2.	Désinfection des échantillons	28
2.4.3.	Dilacération des échantillons	29
2.4.4.	Isolement des isolats.....	29
2.4.5.	Repiquage et purification.....	30
2.4.6.	Conservation des isolats	30

2.5.	Caractérisation phénotypique des isolats.....	30
2.5.1.	Caractères biochimiques et physiologiques.....	30
2.5.1.1.	Recherche des pigments fluorescents.....	30
2.5.1.2.	Détermination du Gram au KOH à 3%	30
2.5.1.3.	Vérification de pouvoir pathogène sur Tabac.....	31
2.5.1.4.	Recherche de l'enzyme levane sucrase	32
2.5.1.5.	Recherche de l'enzyme catalase	32
2.5.1.6.	Recherche des enzymes cytochromes oxydases	32
2.5.1.7.	Recherche des enzymes pectinolytiques	32
2.5.1.8.	Mode d'utilisation du glucose sur Hugh et Leifson	33
2.5.1.9.	Recherche de l'arginine dihydrolase (Milieu de Thornley).....	33
2.5.1.10.	Tests sur Galerie API 20 ^E	33
2.5.2.	Vérification du pouvoir pathogène des isolats sur le trèfle	33
2.6.	Tests complémentaires pour l'identification des bactéries bénéfiques et où.....	34
	Nodulaires.	34
2.6.1.	Aspect morfo-cultural sur milieu YMA.....	35
2.6.2.	Absorption du rouge Congo.....	35
2.6.3.	Fixation d'azote atmosphérique	35
2.6.4.	Solubilisation du phosphore.....	35
2.6.5.	Solubilisation du zinc	35
2.6.6.	Production d'indole (AIA)	36
2.6.7.	Production d'amylase	36
2.6.8.	Production de protéase	36
2.6.9.	Vitesse de croissance des bactéries	36
2.6.10.	Test de nodulation	36
2.7.	Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactéries isolées	38
2.7.1.	Technique de strie croisée par confrontation simultanée	39
2.7.2.	La technique des cultures en spots par la confrontation simultanée	39
2.8.	. Évaluation de l'effet de biostimulants biofertilisants// biostimulants sur la croissance de bactéries pathogènes	40
2.9.	Caractérisation moléculaire des isolats bactériens par PCR.....	41
2.9.1.	Extraction de l'ADN par lyse des cellules.....	41
2.9.2.	Gel de migration.....	42
3.	Chapitre III : Résultats et discussion.....	45

3.1.	Estimation du nombre d'épis	45
3.2.	Dénombrement des nodules racinaires	46
3.3.	Isolement des isolats.....	49
3.4.	Purification des isolats.....	51
3.5.	Caractères biochimiques et physiologiques.....	52
3.5.1.	Recherche des pigments fluorescents.....	52
3.5.2.	Détermination du Gram au KOH à 3%	52
3.5.3.	Vérification de pouvoir pathogène sur Tabac.....	53
3.5.4.	Recherche de l'enzyme levane sucrase	54
3.5.5.	Recherche de l'enzyme catalase	54
3.5.6.	Recherche des enzyme cytochromes oxydases.....	55
3.5.7.	Recherche des enzymes pectinolytiques.....	55
3.5.8.	Mode d'utilisation du glucose sur Hugh et Leifson	56
3.5.9.	Recherche de l'arginine dihydrolase	57
3.5.10.	Tests sur Galerie API 20 ^E	58
3.6.	Vérification du pouvoir pathogène sur le trèfle	58
3.7.	Tests complémentaires pour l'identification des bactéries nodulaires bénéfiques	60
3.7.1.	Aspect macroscopique sur milieu YMA	60
3.7.2.	Absorption du rouge Congo.....	60
3.7.3.	Fixation d'azote atmosphérique	61
3.7.4.	Solubilisation du phosphore.....	61
3.7.5.	Solubilisation du zinc	62
3.7.6.	Production d'indole (AIA)	63
3.7.7.	Production d'amylase	63
3.7.8.	Production de protéase	64
3.7.9.	Vitesse de croissance des bactéries	64
3.7.10.	Test de nodulation	65
3.8.	Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactéries isolées	68
3.9.	Évaluation de l'efficacité de biostimulant sur la croissance de bactéries pathogènes	70
3.10.	Caractérisation moléculaire des isolats bactériens par PCR.....	71
Conclusion		Error! Bookmark not defined.
Références bibliographiques		80
Annexes		93

Résumé

Ce travail vise à explorer les interactions microbiennes au sein du système racinaire du trèfle d'Alexandrie, cultivé en association avec une variété de blé dur. Cette légumineuse contribue à la fertilité des sols grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique via une symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium*, qui induisent la formation de nodosités racinaires. L'étude porte sur la caractérisation de la diversité microbienne associée aux racines et aux nodules, en mettant en évidence à la fois les bactéries bénéfiques (rhizobia, PGPR) et les bactéries phytopathogènes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* et *Clavibacter*, connues pour leur pouvoir pathogène sur diverses cultures. Des essais d'antagonisme **in vitro** sont réalisés afin d'évaluer les interactions entre les isolats bénéfiques et pathogènes, dans le but d'identifier des microorganismes capables d'inhiber leur développement. Par ailleurs, l'effet de biostimulants d'origine naturelle a également été testé sur ces bactéries pathogènes.

Mots-clés :

Trèfle d'Alexandrie – Nodules – PGPR – Bactéries phytopathogènes – Antagonisme in vitro – Biostimulants – Fixation de l'azote

Abstract:

This study aims to investigate microbial interactions within the root system of Alexandria clover (*Trifolium spp.*), cultivated in association with a durum wheat variety. This legume enhances soil fertility through its ability to fix atmospheric nitrogen via symbiosis with *Rhizobium* bacteria, which induce the formation of root nodules. The research focuses on characterizing the microbial diversity associated with roots and nodules, highlighting both beneficial bacteria (rhizobia, PGPR) and phytopathogenic bacteria belonging to the genera *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, and *Clavibacter*, known for their pathogenic potential on various crops. In vitro antagonism tests were conducted to evaluate the interactions between beneficial and pathogenic strains, aiming to identify microorganisms capable of inhibiting the growth of harmful agents. Additionally, the effect of natural biostimulants was tested against these phytopathogenic bacteria.

Keywords :

Alexandria clover – Nodules – PGPR – Phytopathogenic bacteria – In vitro antagonism – Biostimulants – Nitrogen fixation

المخلص

صنف مع بالتشارك المزرع الإسكندرية برسيم لنبات الجذري النظام داخل الميكروبية التفاعلات دراسة إلى العمل هذا يهدف تكافلية علاقة خلال من الجوي النيتروجين تثبيت على قدرتها بفضل التربة خصوبة في البقولية هذه تساهم. الصلب القمح من بالجذور المرتبط الميكروبي التنوع توصيف على الدراسة تركز. الجذرية العُقد تكوُن تحفَز التي، *Rhizobium* بكتيريا مع لأجناس التابعة للنبات، الممرضة والبكتيريا (PGPR و كالريزوبيا) المفيدة البكتيريا من كل إبراز مع والعقد، أمراض إحداث على بقدرتها المعروفة، *Clavibacter* و *Pantoea*، *Erwinia*، *Xanthomonas*، *Pseudomonas* والممرضة المفيدة السلالات بين التفاعلات لتقييم (in vitro) مخبرية تضاد اختبارات إجراء تم. المحاصيل من العديد في هذه على الطبيعية الحيوية المبيدات تأثير اختبار تم كما. الممرضة العوامل نمو تثبيط على قدرة دقيقة كائنات تحديد بهدف . الممرضة البكتيريا

المفتاحية الكلمات

حيوية مبيدات – المخبري التضاد ممرضة بكتيريا – للنمو محفزة بكتيريا – جذرية عُقد – رايزوبيوم – الإسكندرية برسيم النيتروجين تثبيت –