

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم : الميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Ecologie et environnement

**Spécialité :** *Ecologie microbienne*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Caractérisation des endosymbiotes chez la légumineuse**

***Trigonella gladiata* Stev.**

---

Présenté par : *AOUANE Boutheina*

*Le 22/06/2023*

*AOUANE Aya*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** *M. BENHIZIA Yacine* (Professeur - UFM Constantine 1).

**Encadreur :** *M. CHABBI Rabah* (MAA - UFM Constantine).

**Examineur :** *M<sup>me</sup>. BOUKAOUS Leila* (MRB - CRSP).

**Année universitaire**

**2022 – 2023**

# Remerciements

*Au terme de notre Master, nous nous faisons l'agréable devoir de présenter nos remerciements les plus chaleureux et les plus vifs à **M. CHABBI Rabah** «MAA » à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son entière disponibilité, ses grandes aides, ses orientations, ses précieux conseils, sa patience et surtout sa confiance. Nous lui sommes reconnaissantes aussi d'avoir suscité en nous la passion du devoir accompli. Nous tenons à remercier également **M. Benhizia Yacine** (Professeur – UFM Constantine I). en nous faisant l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire.*

*C'est aussi avec plaisir, que nous exprimons nos remerciements à **M. Boukaous Leila** (MRB – CRSP) qui a bien voulu examiner notre travail. Que toutes ces personnes trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.*



# Remerciements

*Nous remercions chaleureusement **M. BENHIZIA YACINE***

*« Professeur » et directeur du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que pour ses encouragements pour nous durant notre parcours universitaire en Master.*

*Merci infiniment à l'ingénieur et l'équipe de laboratoire du BMC  
« Houda » « Ibtihaje, Hiba, Fatema, Radja »  
pour tout l'aide qu'ils ont nous abonnez pour mettre fin à ce travail.*



# Dédicaces

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail :*

*À ma très chère mère **Laloui Rbiha***

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme*

*Il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a Toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*À mon très cher père **Abd-Nassire***

*La flamme de mon coeur à qui je dois un remerciement profond pour leur sacrifice sans limites, patience, soutien, amour et leur encouragement*

*Tu as toujours été à mes côtés pour lequel je souhaite une longue et heureuse vie pleine de bonheur. Que Dieu vous protège et vous garde*

*À ma grand-mère **Yamina***

*Que Dieu le protège et le garde.*

*À mes frères « **Sief Eddine** » « **Chouaib** » et surtout mon grand frère «*

***Sid-Ali- Mehdi** » Qui est mon deuxième père et mon soutien. Les mots ne suffisent pas pour vous exprimer ma gratitude*

*pour tous vos efforts et votre soutien.*

*À ma belle sœur « **Chaima** ».*

*À les femmes des mes frères « **Nihed** » et « **Khawla** »*

*À la cerise de ma vie « **Elyne Lamar** ».*

*À mon fiancé « **Fouad** » pour tout l'encouragement,*

*Le respect et l'amour que tu m'as offert,*

*Je te dédis ce travail, qui n'aurait pas pu être achevé sans ton éternel soutien et votre Confiance à mes capacités.*

*À mes proches et ma copine « **Feriel** ».*

*Pour mon très cher binôme « **Aya** ».*

*À mes enseignants que je leurs préserve beaucoup de respect et de considération.*

*À ma famille Et pour toutes les personnes qui m'ont soutenu jusqu'à la fin.*

***Boutheina***



# Dédicaces

*Avec joie, fierté et respect, je dédie ce modeste travail :*

*À ma très chère mère **Mederg Narou Wided.***

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit.*

*Ton affection me couvre,*

*Ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force*

*Pour affronter les différents obstacles.*

*À mon très cher père **Azouz.***

*La flamme de mon coeur*

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.*

*À la sœur la plus merveilleuse du monde **Djoughaina.***

*Au plus beau frère **Mohamed Islem.***

*À mon très cher frère **Haïtem** \*\*que dieu aie son âme\*\*.*

*À mes grands parents.*

*Que Dieu les protège et les garde.*

*Au plus proche de mon cœur **Bichou** pour ses encouragements et ses amour.*

*À tous la famille **Aouane** et **Mderg Narou.***

*À ma belle binôme **Boutaina.***

*À mes enseignants que je leurs préserve beaucoup de respect et de considération.*

*À mes proches et mes amis sur facebook.*

*Et pour toutes les personnes qui m'ont soutenu jusqu'à la fin.*



*Aya*

## **Résumé**

Quinze souches bactériennes isolées à partir de nodules racinaires de la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev., collectée dans la wilaya de Khenchela ont été étudiées d'un point de vue phénotypique pour trouver les caractères cellulaires, culturels, physiologiques, et biochimiques. Phénotypiquement, les isolats étudiés sont des coccobacilles à Gram négatif de croissance rapide, ont présenté une bonne croissance à 28 °C et Elles acidifient les milieux BTB et GPA. Les résultats obtenus par caractérisation biochimique sur galerie API 20NE révèle une différence dans le pouvoir d'assimilation des différents substrats ce qui renseigne sur l'existence d'une diversité de l'équipement enzymatique entre les différentes souches isolées.

Ces résultats indiquent donc que les isolats portent des caractères phénotypiques similaires aux (BNL) à croissance rapide. Bien que cette caractérisation reste insuffisante.

**Mots Clés :** Nodule; Légumineuse ; *Trigonella gladiata* Stev. ; BNL; Galeries API 20NE.

## **Abstract**

Fifteen bacterial strains isolated from root nodules of the wild *Trigonella gladiata* Stev. This isolates collected in the wilaya of Khenchela were studied from a phenotypic, cellular, cultural, physiological and biochemical characteristics.

Phenotypically, the isolates studied are Gram-negative coccobacill , showed good growth at 28 °C and acidified the BTB and GPA media. Results obtained by biochemical characterization on API 20NE galleries revealed a difference in the assimilative capacity of the different substrates, which enzymatic equipment between the different strains isolated.

These results indicate that the isolates have similar phenotypic characteristics to fast-growing BNL, although this characterization remains insufficient.

**Keywords:** Nodule; Legume; *Trigonella gladiata* Stev. ; BNL; API 20NE galleries.

## ملخص

خمسة عشر سلالة بكتيرية معزولة من العقد الجذرية لنبات بقولي بري *Trigonella gladiata* Stev. تم تجميعها من ولاية خنشلة و التي تم دراستها من منظور النمط الظاهري للعثور عن الصفات الخلوية و الخصائص الزراعية ، الفيزيولوجية و الكيميائية الحيوية. الظاهريا فان العزلات المختارة على شكل عصيات قصيرة سالبة Gram سريعة النمو، أظهرت نموا جيدا عند 28 درجة مئوية ; كما انها تحمض الوسائط GPA و BTB . تكشف النتائج التي تم الحصول عليها من خلال الوصف البيوكيميائية على شرائح api 20NE اختلافا في قوة استيعاب الركائز المختلفة ، و التي تعلمنا عن وجود مجموعة متنوعة من المعدات الانزيمية بين السلالات المختلفة المعزولة . تشير هذه النتائج الى ان العزلات تحمل سمات نمطية مشابهة لخصائص البكتيرية المكونة للعقد الجذرية للبقوليات (BNL) من خلال النمو السريع . لكن هذا الوصف لا يزال غير كاف.

## الكلمات المفتاحية:

العقدة; بقوليات ; *Trigonella gladiata* Stev. ; BNL ; شرائح API 20NE.



## Liste des Figures

<b>Figure 01</b> : cycle de l'azote.....	<b>02</b>
<b>Figure 02</b> : le processus de fixation biologique de l'azote .....	<b>06</b>
<b>Figure 03</b> : Nouvelle Taxonomie des Leguminos .....	<b>07</b>
<b>Figure 04</b> : <i>Trigonella gladiata</i> Stev. ....	<b>09</b>
<b>Figure 05</b> : Diagramme de la distribution des espèces bactériennes nodulant les légumineuses appartenant aux classes $\alpha$ et $\beta$ - <i>proteobacteria</i> .....	<b>11</b>
<b>Figure 06</b> : Les symbiotes bactériens au sein des protéobactéries.....	<b>12</b>
<b>Figure 07</b> : les étapes de l'établissement de la nodulation.....	<b>15</b>
<b>Figure 08</b> : Localisation de La wilaya De Khenchela.....	<b>18</b>
<b>Figure 09</b> : Conservation des nodules .....	<b>19</b>
<b>Figure 10</b> : Repiquage sur tube gélose incliné.....	<b>23</b>
<b>Figure 11</b> : Teste de recherche du nitrate réductase.....	<b>24</b>
<b>Figure 12</b> : La Galerie api 20NE .....	<b>26</b>
<b>Figure 13</b> : Résultat du test de stérilisation .....	<b>27</b>
<b>Figure 14</b> : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur YMA+RC .....	<b>28</b>
<b>Figure 15</b> : Aspect visqueuse des isolats sur YMA (boîte).....	<b>29</b>
<b>Figure 16</b> : Résultats après la conservation des isolats sur YMA+CaCO <sub>3</sub> (tube).....	<b>29</b>
<b>Figure 17</b> : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur GPA+BCP.....	<b>30</b>
<b>Figure 18</b> : Résultat du test de vitesse de croissance YMA+BTB.....	<b>31</b>
<b>Figure 19</b> : Résultat de la coloration de Gram (Objectif x100).....	<b>32</b>
<b>Figure 20</b> : Résultats de Mannitol mobilité.....	<b>33</b>
<b>Figure 21</b> : Résultat du test de la Nitrate-réductase.....	<b>35</b>
<b>Figure 22</b> : Résultat de l'hydrolyse de l'urée .....	<b>36</b>
<b>Figure 23</b> : Résultat de l'hydrolyse du CMC.....	<b>38</b>
<b>Figure 24</b> : Résultat du test Oxydase.....	<b>39</b>
<b>Figure 25</b> : Résultat du test Catalase.....	<b>39</b>
<b>Figure 26</b> : Resultats des tests biochimiques sur les galeries api 20NE.....	<b>43</b>
<b>Figure 27</b> : Croissance de certains isolats à températures différentes.....	<b>46</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01</b> : Résultat du test mannitol mobilité.....	<b>34</b>
<b>Tableau 02</b> : Résultats des tests biochimiques effectués sur la galerie API 20 NE.....	<b>40</b>
<b>Tableau 03</b> : Croissance des isolats aux différentes températures.....	<b>44</b>

## Liste des Abréviations

**ANDI** : Agence Nationale de Développement de l'investissement.

**BCP** : Pourpre de Bromocrésol.

**BNL** : Bactéries Nodulant les Légumineuses.

**BTB**: Bromotymol Blue.

**CMC**: Carboxy méthyle cellulose.

**EPS** : Exopolysaccharides.

**FN** : Facteur Nod.

**GPA**: Glucose Peptone Agar.

**Hsn**: host specific nodulation.

**HSPs** : Heat Shock Proteins.

**L.** : Abréviations botaniques standard de Carl von Linné.

**LCOs** : lipo-chitooligosaccharidiques.

**LPWG**: The legume Phylogeny Working Group.

**RC**: Rouge Congo.

**Stev.** : Abréviations botaniques standard de Christian von Steven.

**Sym**: Symbiose.

## Table des matières

Liste des Figures.....	i
Liste des Tableaux.....	ii
Liste des Abréviations.....	iii
Introduction .....	01

### Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

<b>I.L'azote.....</b>	<b>02</b>
1.1. Cycle d'azote .....	02
3. La fixation biologique de l'azote .....	03
3.1. La nitrogénase .....	05
<b>II.Les légumineuse.....</b>	<b>06</b>
2. Classification des légumineuses.....	06
3. La légumineuse <i>Trigonella L.</i> .....	08
4 .Intérêts des légumineuses .....	09
<b>III.Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL).....</b>	<b>10</b>
<b>IV.Symbiose <i>Rhizobium</i>-légumineuse.....</b>	<b>12</b>
<b>V.Nodulation.....</b>	<b>13</b>
1. Stratégie de nodulation .....	13
1.1. Pré infection (reconnaissance et attachement) .....	13
1.2.Infection .....	14
1.3. développement du nodule.....	14
2. Substances responsables de la nodulation.....	16
2.1.Les flavonoïdes .....	16
2.2. Les facteurs Nod.....	16
3. Génétique de la nodulation chez les bactéries.....	16
3.1. Gènes de nodulation des Rhizobia (Gènes <i>nod</i> ).....	16
3.2. Les gènes nod communs .....	17
3.3. Les gènes <i>hsn</i> : (host specific nodulation).....	17
3.4. Les gènes <i>nif</i> et les gènes <i>fix</i> .....	17

## Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

<b>I. Isolement des bactéries nodulant le Fenugrec (<i>Trigonella gladiata</i> Stev.)</b> .....	<b>18</b>
1.2. Collecte des nodules .....	18
1.3. Conservation des nodules .....	19
1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules .....	20
1.4.1. Stérilisation de nodules .....	20
1.4.2. Test de stérilisation .....	20
1.4.3. Ecrasement des nodules .....	20
1.4.4. Isolement des bactéries .....	20
<b>2. Caractères cultureux</b> .....	<b>21</b>
2.1. Principaux milieux de culture utilisés .....	21
2.2. Purification des isolats .....	22
2.3. L'examen visuel des colonies .....	22
2.4. Test de la vitesse de croissance.....	22
2.5. Conservation des souches.....	22
2.6. Examen microscopique après coloration de Gram .....	23
2.7. Examen de la mobilité .....	23
<b>3. Caractéristiques phénotypiques des isolats</b> .....	<b>23</b>
3.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques) .....	23
3.1.1. Réduction des nitrates .....	23
3.1.2. Hydrolyse de l'urée .....	24
3.1.3. Activité cellulolytique .....	25
3.1.4. Recherche de l'oxydase .....	25
3.1.5. Recherche de catalase .....	25
3.1.6. Identification biochimique par la Galrie API 20 NE.....	25
3.2. Test physiologique (Effet de la température).....	26

## Chapitre 3 : Résultats et Discussion

<b>1. Isolement des bactéries à partir des nodules</b> .....	<b>27</b>
1.1. Test de stérilisation.....	27
<b>2. Caractères cultureux</b> .....	<b>27</b>
2.1. Purification des isolats .....	27

2.1.1. Croissance sur milieu YMA + Rouge Congo.....	27
2.1.2. Croissance sur milieu YMA.....	28
2.1.3. Croissance sur milieu GPA + BCP .....	30
2.2. Test de la vitesse de croissance.....	31
2.3. Examen microscopique après coloration de Gram .....	32
<b>3.Examen de la mobilité.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Caractéristiques phénotypiques des isolats .....</b>	<b>34</b>
4.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques) .....	34
4.1.1. Réduction des nitrates .....	34
4.1.2. Hydrolyse de l'urée .....	36
4.1.3. Activité cellulolytique.....	37
4.1.4. Recherche de l'oxydase .....	38
4.1.5. Recherche de catalase .....	39
4.2. Caractérisation biochimiques sur galerie API 20 NE.....	40
3. Tests physiologiques (Effet de la température) .....	44
<b>Conclusion .....</b>	<b>47</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>49</b>
<b>Annexes</b>	



# Introduction



L'azote est un nutriment essentiel limitant pour le développement des plantes, il est présent en abondance dans l'atmosphère sous forme diazote ( $N_2$ ). Ce dernier n'est pas accessible à la plupart des végétaux. Le  $N_2$  doit subir des processus de transformation biologique réalisé par des micro-organismes appelés bactéries fixatrices d'azote « diazotrophes » qui sont les seuls organismes possèdent le complexe enzymatique nitrogénase qui capable de réduire le diazote moléculaire en ammonium. Cette fixation s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre les légumineuses et les rhizobiums.

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est un processus bénéfique et réciproque permet pour les légumineuses de fixer l'azote atmosphérique par l'intermédiaire des bactéries appelées rhizobiums. Les légumineuses sécrètent des composés phénoliques qui attirent ces bactéries. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable, grâce à leur activité nitrogénase. Par contre, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie.

L'objectif de notre travail est l'isolement et la caractérisation des souches bactériennes, nodulant la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev. , récolté de la Wilaya de Khenchela.

Ce travail est structuré en trois parties :

- une première partie consiste à une synthèse bibliographique.
- La deuxième partie du mémoire concerne la partie pratique depuis l'échantillonnage à l'isolement des bactéries et leur caractérisation phénotypique.
- La troisième et dernière partie est réservée aux principaux résultats obtenus et leur interprétation.

***Chapitre 01***  
***Synthèse***  
***bibliographique***

## **I. La fixation de l'Azote**

### **1. L'azote**

L'azote (N) est omniprésent dans la nature. C'est le constituant majeur de l'atmosphère et parmi les éléments nutritifs nécessaires. Ce nom est paradoxal, d'ailleurs: il vient du préfixe «a-» Privatif et du radical grec «ζωτ» (zoot) vivant alors que l'azote est nécessaire à la vie (Pujic, 2009).

L'azote est un constituant essentiel du protoplasme. Tous les organismes vivants ont besoin de cet élément pour synthétiser les protéines et les acides aminés (Tortora *et al.*, 2003).

Cet élément est également l'un des composants des quatre bases (adénine, thymine, guanine et cytosine) impliquées dans la formation des unités nucléotidiques, ADN et ARN, présentes dans de nombreuses enzymes et dans le noyau tétra-pyrrolique des chlorophylles, et dans d'autres molécules importantes telles que l'ATP (Tourte *et al.*, 2005).

Aussi, il constitue un facteur limitant de croissance des producteurs dans de nombreux écosystèmes lorsqu'il ne soit pas abondant dans le sol et dans l'eau à l'état naturel (Roba, 2016).

### **2. Cycle d'azote**

L'azote représente 78% de l'atmosphère terrestre, ce fait de lui l'élément le plus abondant. Malgré son abondance, Il s'y trouve sous sa forme moléculaire normale diatomique N<sub>2</sub>, Il est un gaz relativement inerte (peu réactif) (Miloud, 2018).

Chez les organismes vivants, ils ont besoin d'azote pour fabriquer des protéines et des acides nucléiques, mais la plupart ne peuvent utiliser la molécule N<sub>2</sub>. L'azote fixée inorganique, souvent sous forme d'ammoniac NH<sub>3</sub> ou d'ions nitrates NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, est la seule forme qu'ils peuvent utiliser. Par conséquent, l'azote représente donc un élément très limitant pour la productivité primaire dans les écosystèmes terrestres et marins (Miloud, 2018).

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique qui décrit les processus de transformation et la manière dont l'azote circule dans l'environnement et la succession des modifications subies par les différentes formes de l'azote (diazote, nitrate, nitrite, ammoniac, azote organique) (Figure 01).

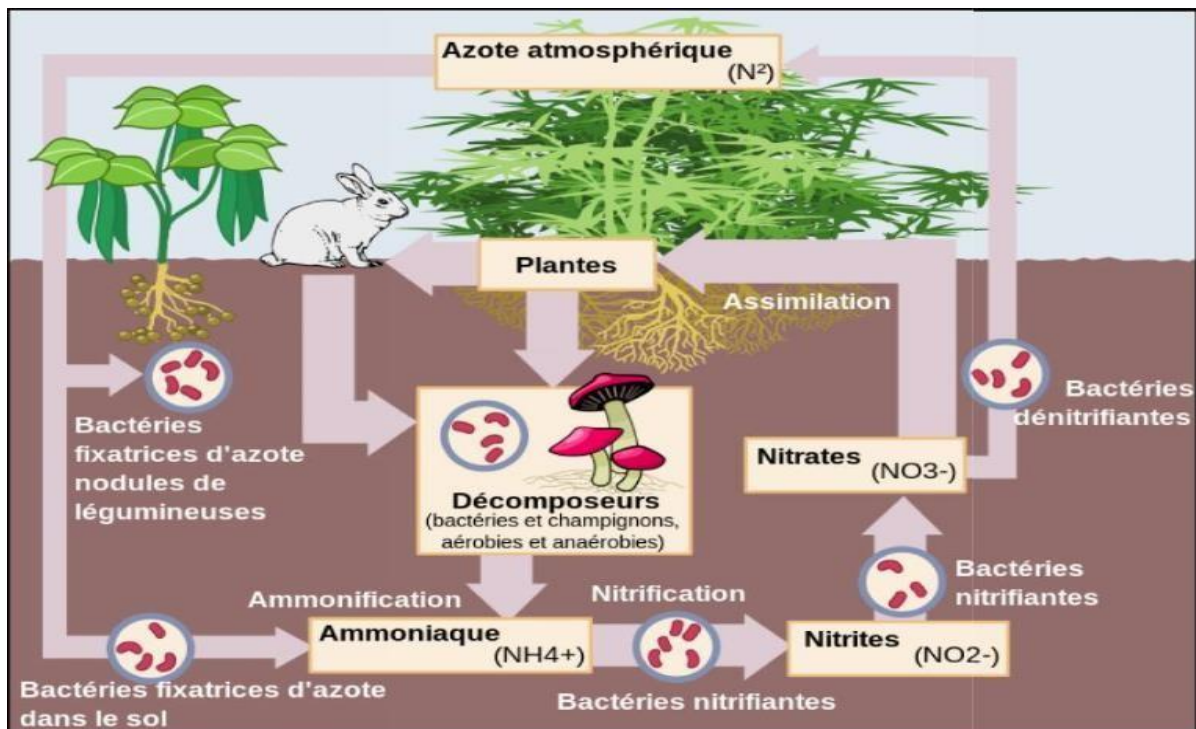


Figure 01 : cycle de l'azote (Pyjic, 2009).

## 2.1. Minéralisation de l'azote organique

La minéralisation est la réaction biologique conduisant à la formation de l'azote minérale (Nitrique et Ammoniacal) à partir de l'azote organique. Après fixation, l'azote moléculaire aboutit à la formation de substances azotées organiques qui, une fois au sol, subissent la minéralisation. Cette renaissance de l'azote minéral se produit en trois étapes : l'ammonification, l'oxydation de l'ammonium et l'oxydation du nitrite ; les deux dernières étapes sont combinées dans ce qu'on appelle la nitrification (Dekak, 2018).

### a) Ammonification

L'ammonification est le processus par lequel les bactéries et les champignons transforment les matières organiques en libérant leurs composants azotés. Plus précisément, c'est le processus par lequel l'azote sous forme organique devient de l'azote ammoniacal ( $NH_3/NH_4^+$ ). Par son manque de spécificité, ce processus peut avoir lieu dans une large gamme de température, d'humidité et de pH du sol (Henintsoa, 2013).

### b) Nitrification

La nitrification est un processus aérobie strict se réalise en deux étapes par deux populations bactériennes différentes, Au cours de la première étape de cette réaction, le genre *Nitrosomonas* oxyde les ions ammonium en nitrites. Dans la deuxième étape, des microorganismes dont le genre *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates (Bekakria et al., 2019).

Equation simplifiée de la nitrosation:  $\text{NH}_4^+ + \frac{3}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$

Equation de la réaction chimique de la nitrification :  $2 \text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_3^-$

### c) Dénitrification

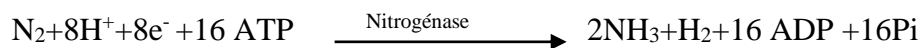
La dénitrification est un processus microbien de respiration alternatif (anaérobie) dans lequel le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est réduit en diazote ( $\text{N}_2$ ). Donc c'est un autre processus clé du cycle de l'azote, puisque c'est le seul permettant le retour au diazote. Les nitrates peuvent être réduits en nitrites par un nombre relativement élevés de microorganismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pracoccus*, *Pseudomonas*. Ces nitrites peuvent être par la suite convertis en ammoniac mais si le potentiel d'oxydoréduction continue à baisser, Il se peut aussi et à cause de sa solubilité élevée dans l'eau, l'azote en forme d'ammoniac ou nitrates non consommées ou non assimilées s'accumulent dans les eaux de ruissèlement et d'infiltration (Figure 01), ce qui pourra favoriser le développement des algues qui constituent un facteur d'accélération du processus de la pollution une fois non consommées (Suty, 2015).

## 3. La fixation biologique de l'azote

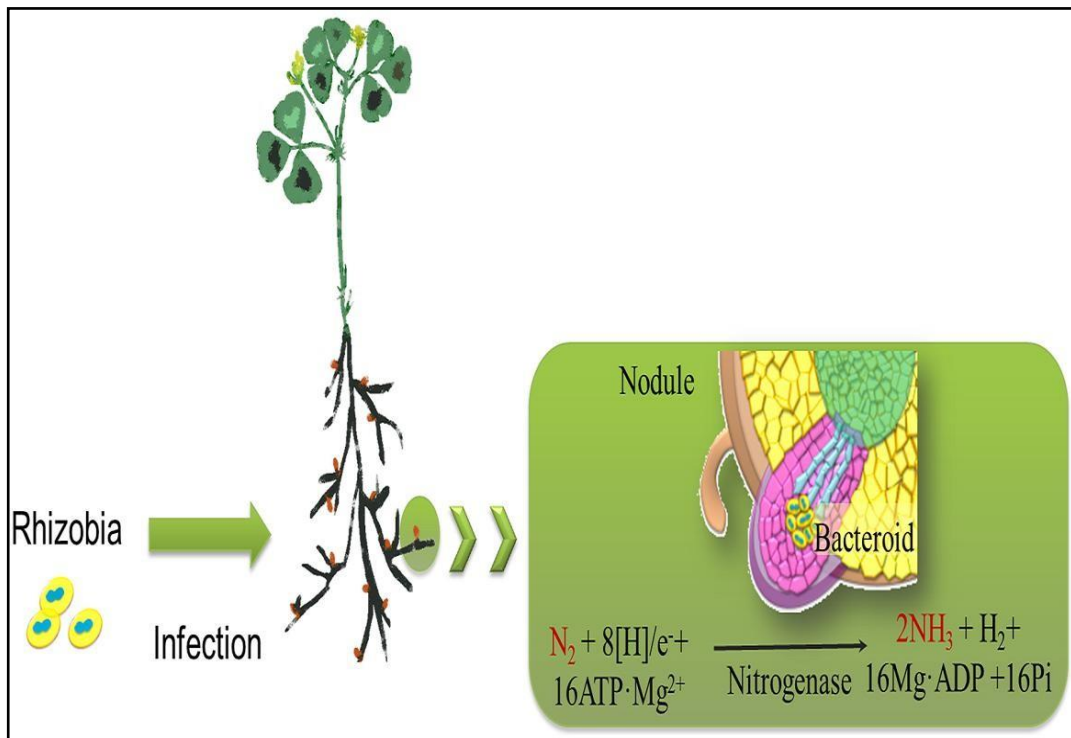
La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains micro-organismes utilisent l'azote de l'air pour leurs synthèses protéiques, Elle est réalisée par un groupe spécifique de procaryotes. Ces organismes utilisent une enzyme appelée nitrogénase pour catalyser la transformation de l'azote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ) en azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), forme azotée assimilable par la plante (Franche et al., 2009). Elles sont donc dépendues d'organismes procaryotiques essentiellement les bactéries qui possèdent la nitrogénase qui est une enzyme capable de réduire l'azote atmosphérique dont les cellules eucaryotes sont totalement dépourvues (Figure 02), la vitesse du processus de fixation limite la croissance végétale dans beaucoup de situations (Shingh, 2017).

**a. La nitrogénase**

La nitrogénase la plus étudiée est le système contenant le molybdène et consiste en deux métalloprotéines, la dinitrogénase (protéine MoFe ou composant I) et la dinitrogénase réductase (Protéine Fe ou composant II). L'azote moléculaire est un gaz inactif et possède une triple liaison entre les deux atomes. Cela nécessite également une grande dépense d'ATP (énergie d'activation élevée). Au moins 8 électrons et 16 molécules d'ATP par paire d'électron sont requis (Willey et *al.*, 2018 ; Pratt et Cornely, 2019). La réaction nette est :



Dans un environnement aérobie, les protéines de la nitrogénase sont dénaturées et ne peuvent fonctionner, l'activité nitrogénase est rapidement inactivée car très sensible. Pour cela et à fin d'assurer sa protection et son bon fonctionnement dans une cellule, de nombreuses bactéries fixatrices d'azote sont confinées aux habitats anaérobies ou effectuent la fixation d'azote quand l'oxygène se raréfie (Pratt et Cornely, 2019). Par exemple chez de nombreuses cyanobactéries, la protection est assurée par une structure spéciale (hétérocyste). Et chez les plantes légumineuses, la fixation symbiotique de l'azote est maintenue dans l'intérieur des nodules racinaires, ce qui confère une niche protectrice à ce complexe enzymatique en plus de la présence la **Leghémoglobine** (protéine végétale) qui va protéger la nitrogénase en fixant l'oxygène et en le maintenant à une faible pression partielle (Suty, 2015).



**Figure 02:** Schéma représente le processus de fixation biologique de l'azote (Teng et al., 2015).

## II. Les légumineuses

### 1. Définition

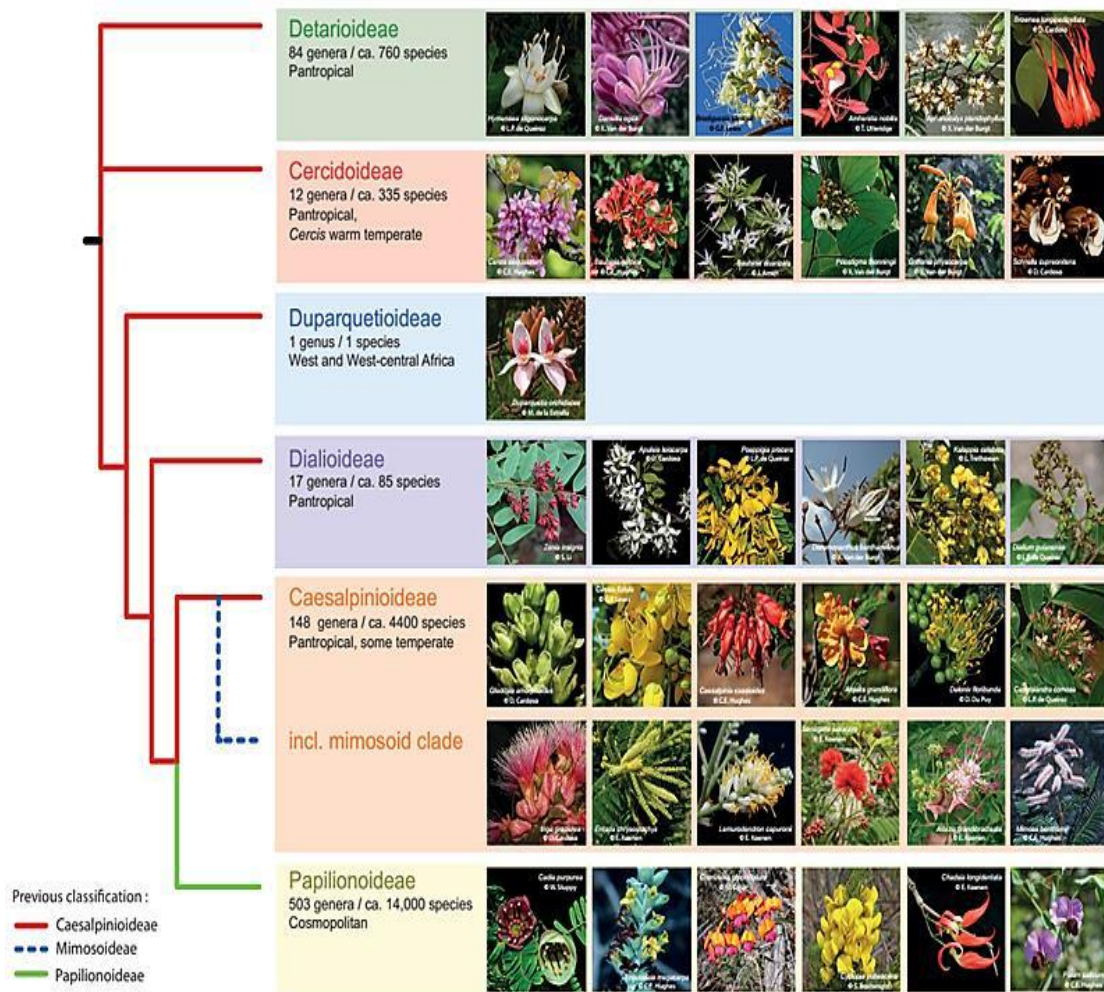
Les Légumineuses (*Leguminosae*) ou Fabacées (*Fabaceae*), avec 35 tribus et plus de 19500 espèces réparties sur environ 765 genres forment, après les Astéracées et les Orchidées, la troisième plus grande famille par ordre d'importance chez des Angiospermes (ou plantes à fleurs) en terme de richesse spécifique (Azani *et al.*, 2017). En termes d'importance économique et agricole, les Fabacées occupent la seconde place après les Poacées (Koenen *et al.*, 2020).

Ces plantes sont largement caractérisées par leurs structures florales inhabituelles, leurs fruits et leur capacité à former des nodules en association avec les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, ce processus permet aux légumineuses d'être cultivées sans utilisation d'engrais azoté (Sierra et Tournebize, 2019).

### 2. Classification des légumineuses

Les légumineuses font partie de la famille des *Fabaceae* (ou *Leguminosae*), de l'ordre

des *Fabales*, de la classe des *Dicotyledonae* et de la sous classe des *Rosidaeae*. Elles se subdivisent actuellement en six sous familles (Figure 03) au lieu de trois : *Papilionoidea*, *Caesalpinioideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae*. Les *Papilionoideae* représentent la sous famille la plus diversifiée, comprenant 478 genres et environ 14000 espèces tropicales et tempérées (Andrews et Andrews, 2017).



**Figure 03** : Nouvelle Taxonomie des Leguminosae en six sous-familles (LPWG, 2017) Cette nouvelle classification de la famille des légumineuses, représentant l’opinion unanime de la communauté internationale de la systématique des légumineuses, aborde le problème de la non-monophylie connue depuis longtemps de la sous-famille reconnue *Caesalpinioideae*, en reconnaissant six sous-familles monophylétiques qui repose sur un support robuste. L’ancienne sous-famille des *Mimosoideae* est nichée au sein de la *Caesalpinioideae* circonscrite et est désigné de manière informelle comme le clade Mimosoïde.



Parmi les plantes appartenant à la famille des Fabacées, on retrouve le genre *Trigonella* appelé aussi Fenugrec.

### **3. La légumineuse *Trigonella* L.**

#### **a. Définition**

La *Trigonella* L. est une plante herbacée annuelle, à feuilles trifoliolées, à folioles denticulées, ayant deux stipules. Elle donne naissance à des fruits en forme de gousses linéaires ou oblongue, déhiscente ou non et rostrée (Quézel et Santa, 1962).

#### **b. *Trigonella gladiata* stev.**

- Plante annuelle de 5-25 cm, couchée ou ascendante, velue.
- folioles oblongues en coin, dentées au sommet.
- stipules entières.
- fleurs blanchâtres, assez petites (8-10 mm), solitaires ou géminées, sessiles à l'aisselle des feuilles.
- calice très velu, à dents égales, plus courtes que le tube.
- étendard plus long que les ailes et la carène obtuse.
- gousse dressée, longue de 2-4 cm, linéaire-lancéolée, arquée, velue 1 à nervures longitudinales saillantes, terminée par un bec long de 1 à 2 cm.
- 4-8 graines ovoïdes, fortement tuberculeuses, roussâtres.
- Écologie : Lieux secs et pierreux du Midi : Provence et Dauphiné jusqu'à l'isère ; Languedoc jusque dans l'Ardèche et l'Aveyron ; Roussillon ; Charente-Inférieure.
- Répartition : Europe méridionale ; Asie occidentale ; Afrique septentrionale.
- Floraison : Mai-juin (Tela botanica, 2023).
- Sexualité : hermaphrodite.
- Pollinisation : entomogame.
- Dissémination : épizoochore.

c) **Taxonomie de la plante (*T.gладиata* Stev.)**

Règne : Plantae.

Sous-Règne : Trachiobionta.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnolipsida.

Sous-classe : Rosidae.

Ordre : Fabales.

Famille : Fabaceae.

Genre : *Trigonella*.

Espèce : *T.gладиata* Stev.



**Figure 04 :** *Trigonella gladiata* stev.

**4. Intérêts des légumineuses**

Les légumineuses sont d'une importance considérable pour l'homme et pour l'environnement, elles présentent de différents intérêts dans plusieurs domaines notamment: agro-écologique, économique, alimentaire, industriel et médical.

Les légumineuses sont un élément clé de l'agriculture durable et peuvent offrir de nombreux avantages économiques et environnementaux. Elles représentent en effet des aliments très nutritifs pour l'homme et l'animal et des nutriments essentiels aux écosystèmes (Prospero et *al.*, 2013).

Les légumineuses sont une source d'engrais vert, elles contribuent naturellement à enrichir le sol en azote. Certaines légumineuses sont utilisées en phytoremédiation, pour le piégeage et la dégradation de contaminants du sol, tels : les métaux lourds (Afzal et *al.*, 2014). Elles sont aussi des sources importantes de nutriments (protéines, vitamines, sucres...etc.). En plus de leur consommation par l'homme, les légumineuses sont utilisées dans l'alimentation des animaux, comme fourrage vert ou sec (Zaidi et kaved, 2017).

En industrie, elles peuvent être broyées en farine, ou sous forme liquide pour production du lait et du yaourt, aussi utilisé dans la fabrication des : plastiques biodégradables, huiles, gommes, encres, teintures, médicaments, parfums et substances antimicrobiennes (Iskounen, 2012). Les légumineuses sont également utilisées dans la médecine populaire (Abderrahim et Imakhloufene, 2016).

### III. Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL)

Le premier à isoler une bactérie à partir des nodules racinaires, qu'il appela *Bacillus radicicola* fut Beijerinck (1888). Par la suite, Frank en (1889) l'a dénommé *Rhizobium leguminosarum* (Kahindi, 1997 ; Terefework, 2002).

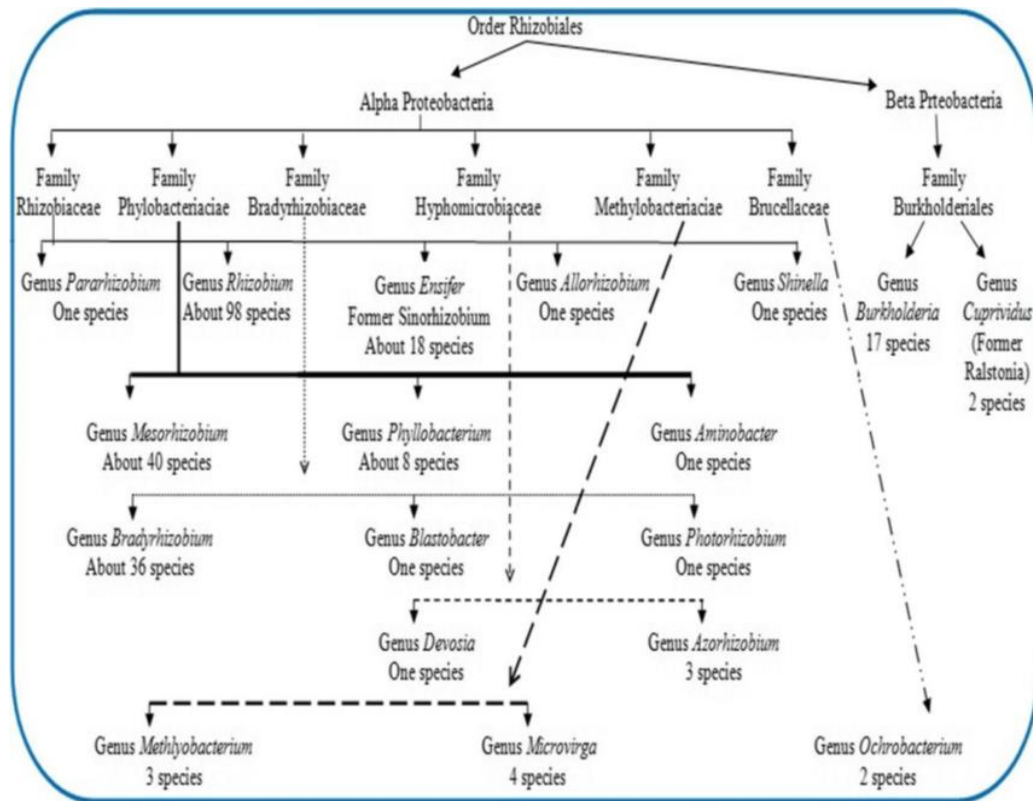
Rhizobia (rhizobiums) est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les légumineuses et de fixer l'azote atmosphérique en symbiose. En 2002 Moulin a proposé de substituer au terme « rhizobia » qui est un terme dérivé du nom de genre *Rhizobium*, le terme BNL ou Bactéries Nodulant les Légumineuses (Zakhia et al., 2004). En effet, il a été admis que les BNL appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* qui comportent en outre les genres : *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Giraud, 2007).

Ces bactéries se présentent à l'état libre sous forme de bâtonnets à Gram négatif, relativement courts et arrondis à leurs extrémités, de taille moyenne (1.2 à 3 µm de long), non sporulantes et mobiles à l'état jeune par 1 à 6 flagelles. Elles sont aérobies strictes à tendance micro-aérophile, hétérotrophes et diazotrophes (fixatrices d'azote atmosphérique) (Jordan, 1984 ; Maclean et al., 2007).

La taxonomie moderne des rhizobiums inclut les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) et *Azorhizobium* (Sawada et al., 2003) qui appartiennent à la classe des Alphaprotéobactéries. En outre, et grâce aux progrès des méthodes moléculaires, d'autres genres ont été découverts plus tard comme bactéries capables d'induire des nodules et sont décrites dans d'autres genres d'Alphaprotéobactéria et Betaprotéobactéria, y compris *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Microvirga* (Radl et al., 2014), *Devosia* (Rivas et al., 2003), *Phyllobacterium* (Zakhia et al., 2006), *Shinella* (Lin et al., 2008) *Burkholderia*, *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Moulin et al., 2001).

Plus récemment, Shamseldin et al. (2017) ont décrit environ 238 espèces réparties en 18 genres des bactéries symbiotiques capables de noduler les racines des légumineuses et répertoriés dans les classes de  $\alpha$  et  $\beta$ -proteobacteria (Figure 05), Ces espèces se répartissent également en sept familles (Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Brucellaceae et Burkholderiaceae) et deux ordres, à savoir les Rhizobiales et les Burkholderiales. L'ordre des Rhizobiales renferme les six premières familles. Par conséquent, il apparaît clairement que la taxonomie actuelle des Rhizobia nodulants progresse rapidement en raison des dernières avancées en matière de

technologie omique basée sur la biologie moléculaire, par exemple, génomique, protéomique, transcriptomique et métabolomique (Rao *et al.*, 2018).



**Figure 05:** Diagramme de la distribution des espèces bactériennes nodulant les Légumineuses appartenant aux classes  $\alpha$  et  $\beta$  *proteobacteria* (Shamseldin *et al.*, 2017).

En 2004, Benhizia et ses collaborateurs ont suggéré que des bactéries appartenant à la classe *Gamma-Proteobacteria* pouvaient, elles aussi, noduler les racines de la plante fourragère *Hedysarum* sans qu'il y ait une validation. Mais en 2010, d'autres études menées par Shiraishi et son équipe qui portaient sur la nodulation chez *Robinia pseudoacacia* confirmaient cette théorie, Ourarhi *et al* en 2011; Peix *et al* en 2012, 2015; Ibañez *et al* en 2017 ; boukaous en 2020, tous ces dernier confirmaient que la classe *gamma-proteobacteria* est vraiment existe (Figure 06).

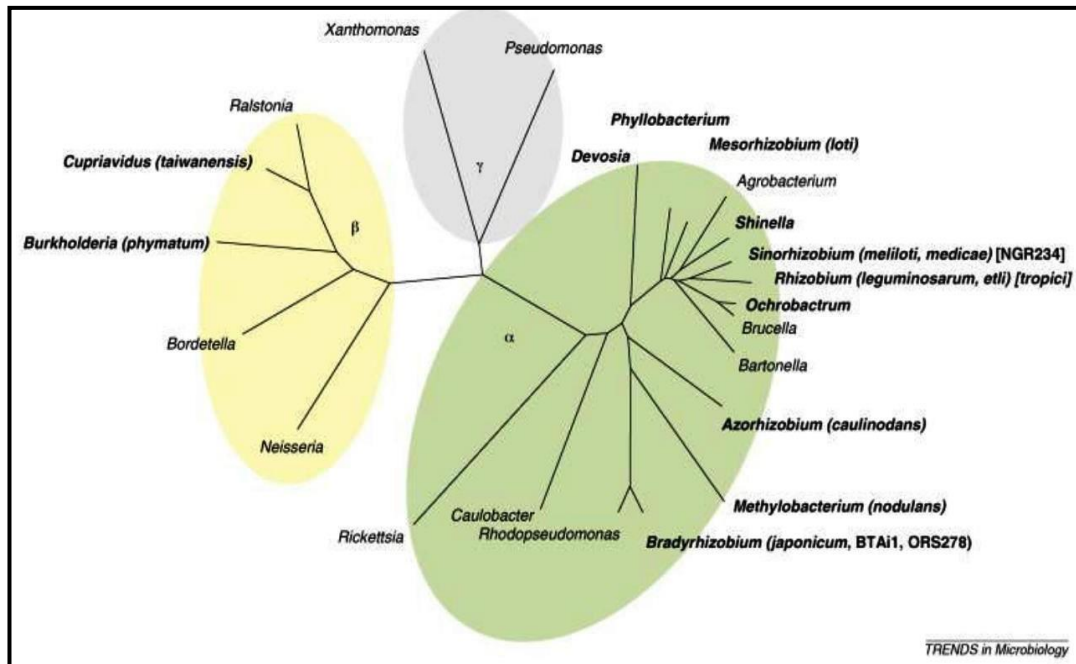


Figure 06: Les symbiotes bactériens au sein des protéobactéries (Domergue, 2017).

#### IV. Symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La symbiose est la forma la plus ancienne des interactions plante-microorganismes, elle agit sur les deux partenaires : la plante hôte et la bactérie. Cette évolution influe donc de façon concomitante sur la plante qui fabrique de nouveaux tissus pour abriter les micro-organismes et acquière de nouvelles capacités métaboliques (fixation d'azote) et sur la bactérie où des récepteurs spécifiques évoluent permettant une reconnaissance et un attachement spécifique à la plante (Boukhatem, 2013). Cette association est reconnue depuis plus de 60 million d'années d'évolution (wang et *al.*, 2017). Elle est très fréquente dans les Papilionoideae, moins fréquente dans le clade mimosoïde et rare dans le reste du groupe Ceasalpinoideae (Andrews et *al.*, 2018).

Parmi les relations intimes du type symbiotique : La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du genre *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfique réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires (Nelson et Sadowsky, 2015 ; Clua et *al.*, 2018).

L'association rhizobia-légumineuses aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable (Vertes et *al.*, 2010).

## **V. Nodulation**

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique. Les nodules formés sont le résultat d'un dialogue moléculaire entre le rhizobium et la plante hôte.

Lorsque la nodulation a lieu, le nombre de nodosités mis en place au sein du système racinaire de la légumineuse est proportionnel aux besoins en azote de la plante pour sa croissance (Voisin, 2015). Le nodule de légumineuses est le résultat d'interactions fort complexes entre le partenaire bactérie (*Rhizobium*) et la racine à laquelle il s'est spécifiquement associé. Dans le nodule, le *Rhizobium* augmente de dimension, change de forme pour devenir un bactéroïde (Bounaama, 2014). Dans tous les cas, le nodule comporte en allant de l'extérieur vers l'intérieur l'épiderme et le cortex externe, le parenchyme nodulaire (appelé antérieurement cortex interne), qui renferme les tissus vasculaires et la zone centrale infectée, qui est le siège de la fixation de la N<sub>2</sub> (Bounaama, 2014).

Sur la base de leur morphologie, leur structure et la durée du fonctionnement du méristème nodulaire, les nodules des légumineuses se subdivisent en deux catégories : les nodules déterminés et les nodules indéterminés (Lebida, 2009). Les nodules de type indéterminé sont formés par les légumineuses issues de milieux tempérés comme la luzerne, le pois ou le trèfle. Ces nodules se développent à partir des cellules du cortex interne (Vernié, 2008). Il a un méristème apical persistant et adopte une forme cylindrique (Coba et al., 2018). Les nodules de type déterminé sont formés par des légumineuses d'origine tropicale comme le soja ou le haricot. Ces nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe et sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant (Vernié, 2008). Il a un méristème latéral qui reste actif pendant quelques jours. Après l'arrêt de l'activité méristématique, le nodule se développe par expansion cellulaire et adopte une forme sphérique (Coba et al., 2018).

### **1. Stratégie de nodulation**

#### **1.1. Pré infection (reconnaissance et attachement)**

Initialement, L'établissement de la symbiose entre légumineuses et Rhizobia nécessite une reconnaissance mutuelle des deux partenaires, La symbiose *Rhizobium*-légumineuses commence par un échange de signal entre la plante hôte et son microsymbiote. Les racines des légumineuses sécrètent des composés phénoliques, principalement (iso) flavonoïdes. Ces flavonoïdes, synthétisés et sécrétés, agissent comme des molécules de signalisation, attirent

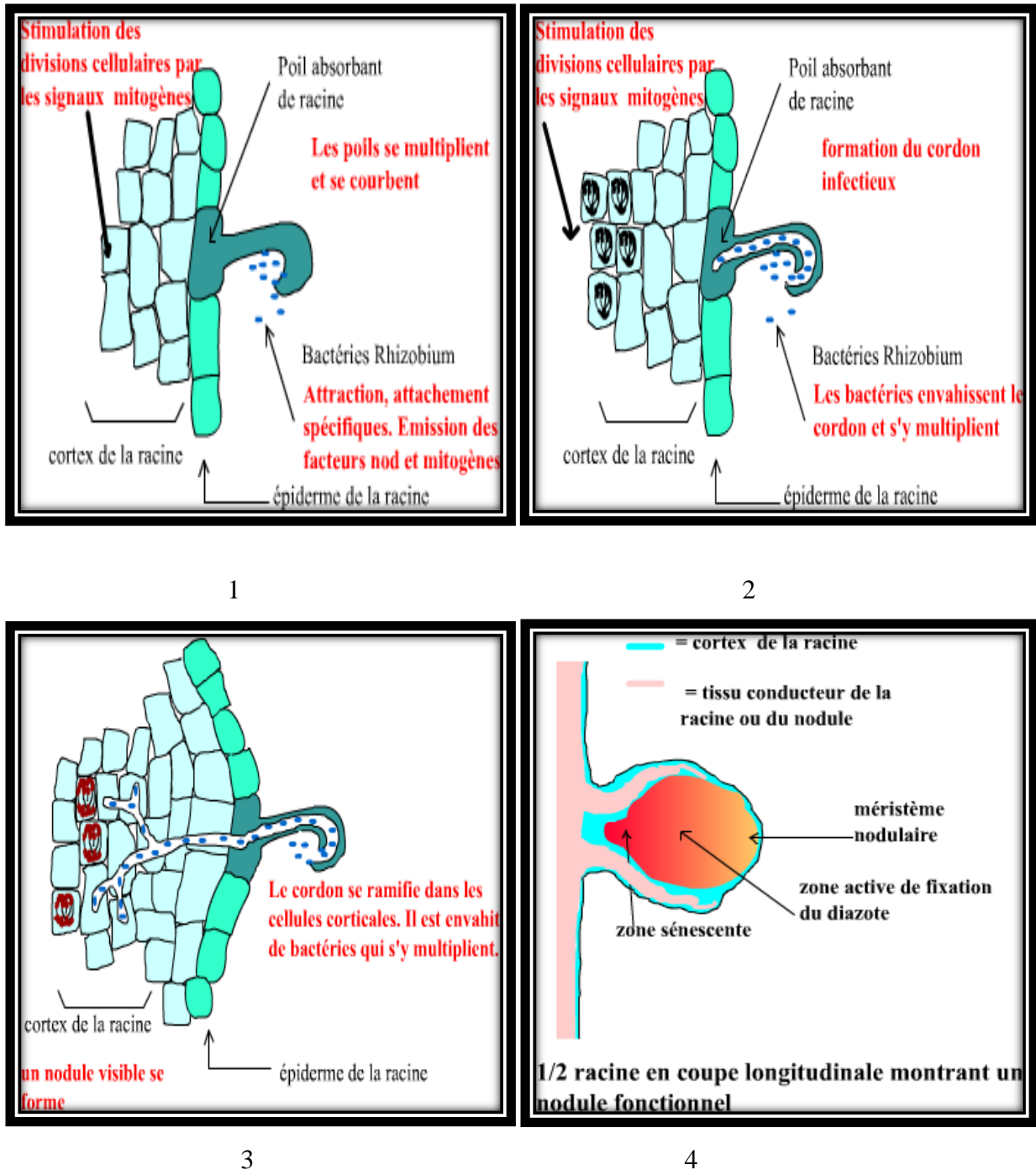
les Rhizobia vers les plantes hôtes et induisent l'expression des gènes Nod qui déclenchent les premières étapes du développement des nodules (Saidi, 2021).

## **1.2. Infection**

L'infection débute après l'attachement du rhizobia aux racines de la plante, Grâce à un mécanisme d'invagination, les bactéries peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules végétales par des filaments infectieux (Figure 07), Ce filament se développe dans le cortex de la racine, vers la base de la cellule constituant le poil radicaire jusqu'à une région appelée le Primordium. C'est cette division cellulaire qui aboutit à la formation d'une nodosité. (Prescott *et al.*, 2010), Ce mécanisme d'infection est le plus étudiés et le plus courant, il a été observé chez les légumineuses tempérées : le pois, le Soja, ...etc (Selami, 2015).

## **1.3. Développement de nodule**

Suite à l'infection, l'organogenèse d'un nouvel organe se met en place, cet organe qui est le nodule constitue une niche pour les bactéries. Après Le stade final du processus infectieux est atteint une fois les bactéries sont libérées à l'intérieur des cellules végétales à partir des cordons d'infection (Figure 07). Les bactéries sont intégrées au cytoplasme des cellules végétales du cortex des racines où elles se prolifèrent rapidement, elles prennent des formes plus ou moins globuleuses, parfois branchées devenant ainsi des bactéroïdes. Les bactéroïdes sont enfermées par une membrane de type plasmique dérivant de la cellule végétale et forment ainsi un ensemble nommé Symbiosome. Le nombre de ces bactéroïdes dans une seule cellule infectée peut aller jusqu'à plusieurs milliers d'unité (Figure 07) (Schneider et Huyghe, 2015).



**Figure 07** : schémas représentatifs des étapes de l'établissement de la nodulation (Perrin,2019).

- 1) conversation plante-rhizobium.
- 2) Invasion du poil absorbant et formation d'un cordon d'infection.
- 3) apparition du premier nodule.
- 4) formation des vésicules.



## **2. Substances responsables de la nodulation**

### **2.1. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire produits par les plantes. Plus de 10 000 variants structuraux de flavonoïdes ont été décrits. Les flavonoïdes sécrétés sous forme d'aglycones et de glycosides constituent une grande partie des exsudats racinaires. Le squelette des flavonoïdes est synthétisé par condensation de la 4-coumaryl-CoA fournie par la chalcone synthase, mais plusieurs modifications de cette structure produisent différentes classes de flavonoïdes: flavanones, flavones, isoflavonoïdes, chalcones et anthocyanidines. Les flavonoïdes servent de molécules de signal dans la rhizosphère pour concentrer les Rhizobia compatibles et induire la biosynthèse du Facteur Nod, Ce sont des chimioattractants pour les Rhizobia, des inducteurs de l'expression génique des Nods, des déterminants de la spécificité de l'hôte et des régulateurs du transport de l'auxine dans les racines lors de la formation de nodules (Saidi, 2021).

### **2.2. Facteurs Nod**

En réponse aux flavonoïdes des plantes, les Rhizobia produisent des FN qui induisent la déformation des racines, la formation de fils d'infection, la réponse initiale dans la division cellulaire corticale des racines et la formation des primordia des nodules. Les FN sont structurellement divers et une seule souche rhizobienne peut produire une gamme de ces métabolites. Ils sont produits par des Rhizobia appartenant aux  $\alpha$  et à la majorité des  $\beta$ -protéobactéries (Saisi, 2021).

## **3. Génétique de la nodulation chez les bactéries**

### **3.1. Gènes de nodulation des Rhizobia (Gènes *nod*)**

La capacité des rhizobia à former des nodules repose sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation indispensables à la symbiose. Les gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipo-chitoooligosaccharide (LCOs). Les gènes *nod* sont activés par les flavonoïdes des exsudats racinaires émis par l'hôte. Ils sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire (ou plasmide) du *Rhizobium* appelé plasmide Sym (pour symbiose) (Madigan et Martinko, 2007).

### **3.2. Les gènes *nod* communs**

Les trois (03) gènes *nod* (*nod A*, *nod B*, *nod C*), appelés aussi gènes structuraux, sont des gènes clés de la nodulation car ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod. Sont des gènes dits communs car, rencontrés chez toutes les espèces de

*Rhizobium*. Les gènes *nodA*, *nodB*, *nodC* fonctionnellement interchangeables entre toutes les espèces de *Rhizobium* (Madigan et al., 2007).

### **3.3. Les gènes *hsn* : (host specific nodulation)**

Sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables, présents chez certaines espèces et non chez d'autres. Ils sont, de se fait, responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante assurent les diverses substitutions qui modifient le squelette de base des facteurs Nod (William et Hopkins, 2003).

### **3.4. Les gènes *nif* et les gènes *fix***

#### **3.4.1. Gènes *nif***

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse d'un complexe enzymatique (nitrogénase) responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. On retrouve parmi eux les gènes de structure *nifH*, *nifD* et *nifK*. La nitrogénase est constituée de deux sous-unités fonctionnelles: La dinitrogénase réductase (protéine Fe) codée par le gène *nifH*, est composée de deux chaînes identiques et la dinitrogénase (protéine Mo-Fe) qui est un hétérotétramère, codé par les gènes *nifD* et *nifK* (Ott et al., 2005).

#### **3.4.2. Gènes *fix***

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, essentiels à la fixation d'azote et qui sont rencontrés uniquement chez les fixateurs symbiotiques. Ces gènes sont tous nécessaires pour la fixation de l'azote: les gènes *fixNOQP* codent pour un cytochrome oxydase, *fixGHIS* codent pour la pompe cationique et *fixABCX* codent pour une flavoprotéine (William et Hopkins, 2003 ; Kouakou, 2011).

# *Chapitre 02 :*

## *Matériel et Méthodes*

## I. Isolement des bactéries à partir des nodules (*Trigonella gladiata* Stev.)

Notre travail porte sur les nodules racinaires de la plante *Trigonella gladiata* Stev. Poussant dans la région de Trachet, commune d'El Mahmel à la Wilaya de Khenchela (Figure 08), dont les coordonnées GPS de latitude et de longitude sont respectivement les suivantes : 35.15502°N 7.28839°E.

La wilaya de Khenchela connaît un climat méditerranéen. Les étés sont chauds et secs et les hivers sont froids. La température moyenne annuelle pour la wilaya de Khenchela est de 21 °C degrés et il y tombe 202 mm de pluie chaque année. Il fait sec pendant 232 jours par an en moyenne avec un taux d'humidité estimé à 52 % et un indice UV à 5. (Quand partir pour.fr a été indexé pour la première fois par Google en August 2018).

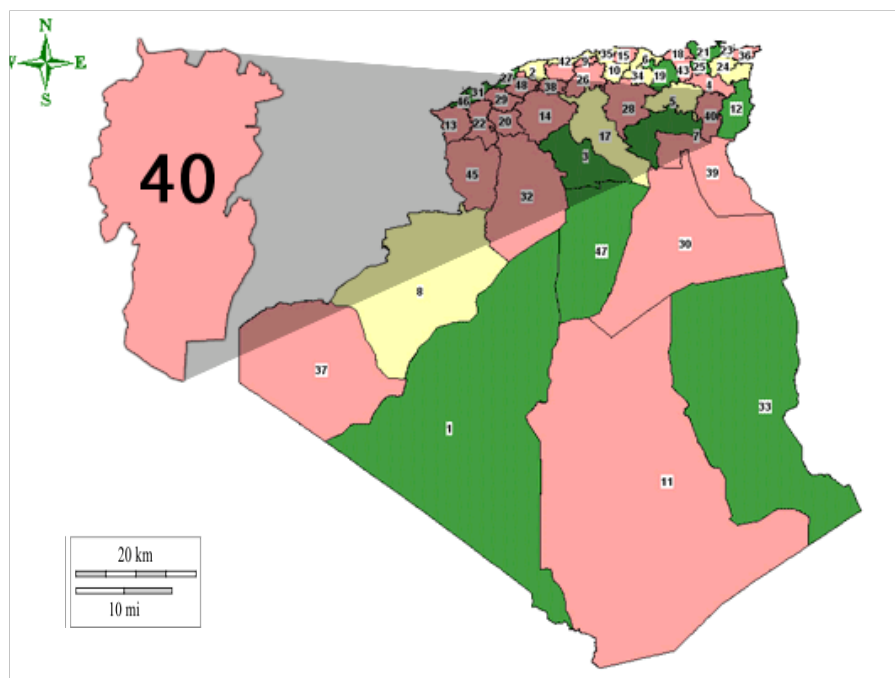


Figure 08 : Localisation de la Wilaya de Khenchela.

### 1.1. Collecte des nodules

On considère que la saison printanière est la meilleure période pour effectuer la sélection et l'échantillonnage des nodules, notamment, celle allant du mois de Mars jusqu'au mois d'Avril, où en plus de l'activité optimale de la plante, la terre est sèche et praticable d'une part, et les nodosités racinaires sont bien distinctes avec leur couleur rougeâtre témoignant de la présence de la leghémoglobine d'une autre part.

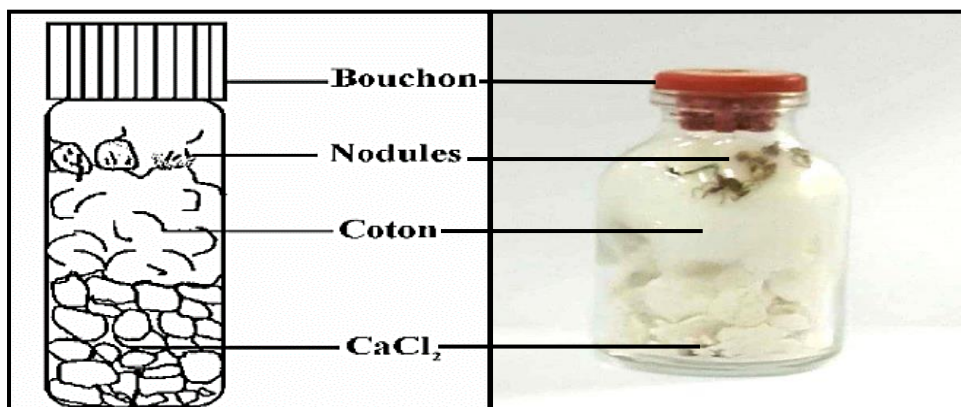
Selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), la collecte est réalisée en creusant environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol à fin d'extraire la plante et son appareil racinaire. En se servant des mains, les racines sont dégagées de la terre mais sans la détérioration des nodules.

Ensuite, les racines sont coupées et transportées dans des sacs en plastique immédiatement au laboratoire.

Au laboratoire, on procède au lavage minutieux des nodules à l'eau courante, puis à leur détachement à l'aide d'un couteau 1 à 2 mm du site d'attache. Après, les nodosités sont séchées avec du papier filtre et conservées.

### **1.2. Conservation des nodules**

Pour une courte durée de stockage et pour un usage immédiat, les nodules frais sont séchés au papier filtre puis réservés directement au réfrigérateur à une température de 4 °C pour une durée de 24 jusqu'à 48 heures (leur congélation est prohibée à cause de l'effet destructif des cristaux de glace). Cependant, pour une longue conservation allant de 06 à 12 mois, on recommande l'emploi du Chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) autant que dessiccateur (Absorbe l'humidité) (Vincent, 1970). Pour la conservation, ce dernier remplira la moitié du flacon utilisé puis recouvert d'un bout de coton sur lequel les nodules seront déposés. Selon Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), la mention du nom de la plante, la date et lieu de collecte ainsi que la date de conservation est obligatoire sur chaque flacon (Figure 9).



**Figure 9** : Conservation des nodules.

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

Si la conservation des nodules est effectuée avec un dessiccateur, ils sont préalablement mis dans de l'eau distillée pendant une nuit à une température de 4 °C (au réfrigérateur), ensuite pour une heure à une température ambiante, cette étape consiste à réhydrater les nodosités. Si non, ils sont directement utilisés après le lavage.

Afin d'isoler les bactéries que contiennent les nodosités, un protocole décrit par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) est exécuté. Il comportera les étapes suivantes.

#### **1.3.1. Stérilisation de nodules**

Les nodules préparés sont immergés dans l'éthanol 95 % pendant dix secondes, puis transférés immédiatement dans une solution de l'hypochlorite de sodium 3 % (NaClO 3 %) pendant trois minutes. Ensuite, ils sont rincés 10 fois dans de l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

#### **1.3.2. Test de stérilisation**

Ce test est effectué pour confirmer la stérilisation externe des nodules et vérifier l'efficacité de la technique adoptée, l'ensemencement est réalisé en faisant passer un nodule stérile sur le milieu YMA additionné de rouge Congo (Annexe 01), puis l'incuber à 28 °C pendant 24 heures.

#### **1.3.3. Ecrasement des nodules**

Dans des conditions d'asepsie totale (sous la hotte à flux laminaire) et sur une boîte de Pétri stérile, les nodules stériles sont déposés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile, où ils seront écrasés à l'aide d'une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen (Vincent, 1970).

#### **1.3.4. Isolement des bactéries**

Après l'écrasement des nodosités et l'obtention d'un jus trouble, ce dernier est étalé à l'aide d'une anse de platine, sur une boîte de Pétri contenant le milieu spécifique YMA (Yeast Mannitol Agar) additionné de rouge Congo (Vincent, 1970). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (Somasegaran et Hoben, 1994) (Figure 11) dans le but d'avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les mêmes nodules sont

ensemencés sur le milieu glucose peptone agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA + BCP). Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C pendant 48 à 72 heures.

## **2. Caractères cultureux**

### **2.1. Principaux milieux de culture utilisés**

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (Annexe 01).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- Milieu liquid: YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe 01).
- Milieu solid: YMA (Yeast Mannitol Agar) (Annexe 01).
- YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo) (Annexe 01).
- YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue) (Annexe 01).
- GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre) (Annexe 01).
- L'autoclavage des milieux se fait à 120 °C pendant 20 minutes (Annexe 01).

## **2.2. Purification des isolats**

Selon les critères de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), La description des isolats implique ce qui suit : Forme, aspect et couleur des colonies sur les différents milieux. La purification nécessite des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes.

La technique consiste, dans une première étape, à ensemercer des tubes qui contiennent le bouillon YMB, puis les incuber pendant 24 h dans un bain-marie à 28 °C et sous agitation (120 tours/ min). Dans une seconde phase et après l'incubation, les tubes présentant un trouble (témoignent d'une croissance), feront l'objet d'un deuxième ensemencement sur le milieu YMA+ RC, Après lequel des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique seront enfin réalisés jusqu'à l'obtention des isolats pures.

## **2.3. L'examen visuel des colonies**

Cet examen consiste à décrire l'aspect macroscopique des colonies obtenues sur les milieux YMA, YMA+RC et GPA+BCP.

## **2.4. Test de la vitesse de croissance**

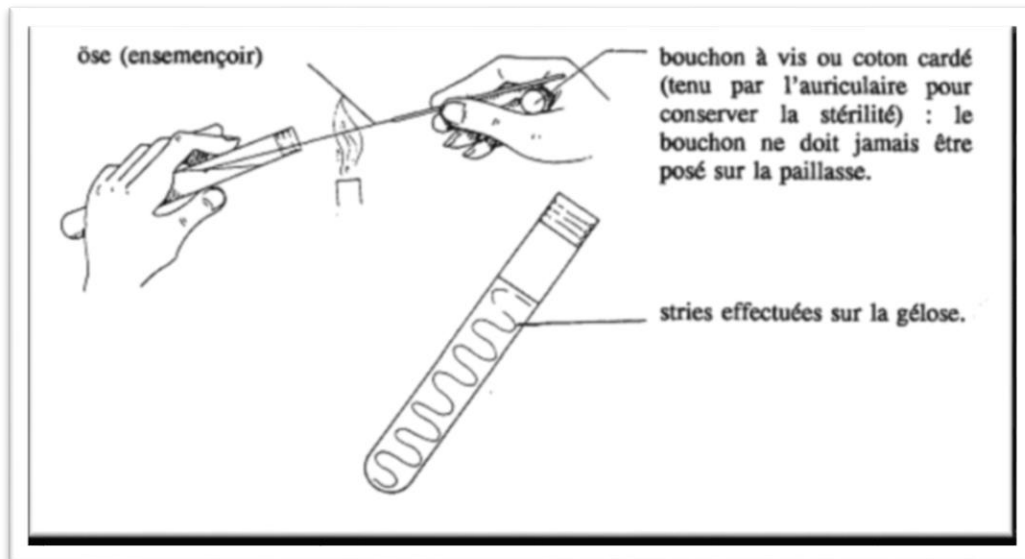
Cet examen consiste à cultiver nos isolats sur le milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB), qu'on incube à 28 °C pendant cinq jours durant lesquels, une lecture quotidienne est effectuée à fin d'observer et noter tout virage de couleur de milieu.

## **2.5. Conservation des souches**

Plusieurs techniques de conservation sont possibles, dans le cadre du présent travail, on a utilisé la méthode suivante :

La conservation est réalisée sur le milieu YMA additionné de 1- 3 g/l de CaCO<sub>3</sub> ayant le rôle d'agent neutralisant l'acidité. Le milieu autoclavé est répartie dans des tubes à essai formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle et à l'aide d'une anse de platine, des stries régulières sont effectuées à la surface de la gélose (Figure10). Suite à une incubation à 28 °C pendant trois jours, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4 °C, ce qui permet une longue durée de conservation allant de six à douze mois (Vincent, 1970).





**Figure 10** : Repiquage sur tube gélose incliné (YMA) d'après (Vincent ,1970).

## 2.6. Examen microscopique après coloration de Gram

La coloration de Gram est d'un pouvoir discriminant trop élevé, dû à l'exploitation des propriétés biochimiques de la paroi bactérienne. Grâce à cette technique, les bactéries sont distinguées en deux grands groupes : les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (Annexe 03).

## 2.7. Examen de la mobilité

Le milieu Mannitol Mobilité est un milieu de culture permettant de mettre en évidence l'utilisation du Mannitol et la mobilité bactérienne par ensemencement sur tubes incliné par pique central à l'aide d'une anse de platine incubé à 28 °C pendant 72 h.

## 3. Caractérisation phénotypique des isolats

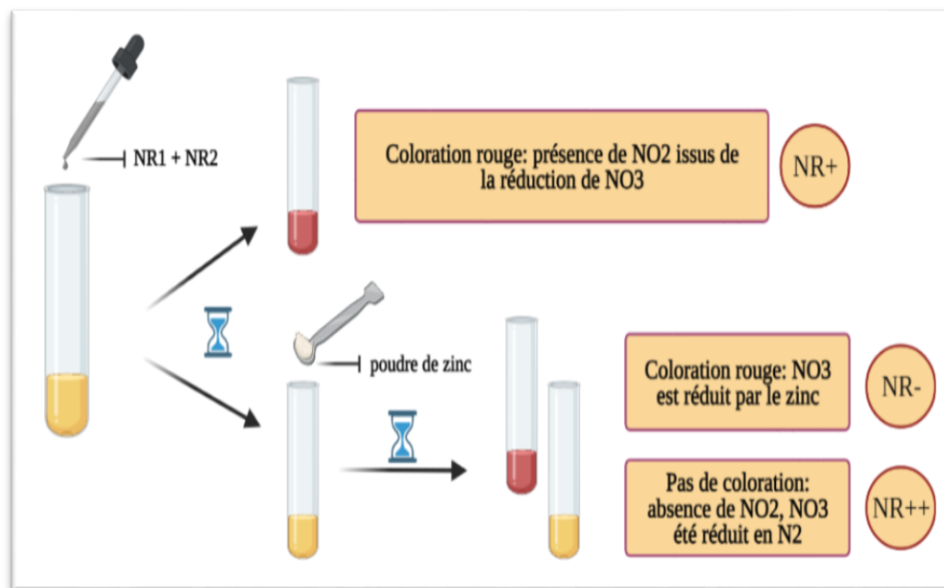
### 3.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques)

Notre objectif est de mettre en évidence des enzymes synthétisées par les bactéries à l'exemple de la nitrate-réductase, l'uréase, la cellulase, la catalase et l'oxydase.

#### 3.1.1. Réduction des nitrates

Les souches ont été mises en culture dans des tubes contenant 5 ml TY (Tryptone Yeast) (Annexe 01) pendant 6 jours à 28 °C. La réduction des nitrates ( $NO_3^-$ ) est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes des réactifs NR1 et NR2 (Nitrate réductase 1 et 2)

dans chaque tube (Figure 11), l'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates ont été réduits en nitrites ( $NO_2^-$ ). Si le milieu reste incolore on rajoute une pincée de poudre de zinc (Zn) pour vérifier la présence ou l'absence des nitrates non dégradés dans le milieu. Après quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge signifie la présence des ions nitrates (résultat négatif) et l'absence de coloration du milieu indique l'absence d'ions nitrates dans le milieu (résultat positif), donc les bactéries ont dégradé les nitrates au-delà du stade nitrites  $NR^+$  (Delarras, 2014).



**Figure 11:** Teste de recherche du nitrate réductase

### 3.1.2. Hydrolyse de l'urée

L'enzyme recherchée est dite « Uréase », elle catalyse l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et d'ammonium (William et Hopkins, 2003). Ce dernier responsable de l'alcalinisation de milieu.

Pour sa mise en évidence, les isolats sont cultivés à 28 °C pendant 72 heures sur le milieu YMA (Annexe 01) auquel, il est rajouté 2 % (p/v) d'urée et 0,012 g de Rouge de Phénol comme indicateur de pH, qui en cas de réaction positive, il vire vers le rose Indigo. A cause de sa thermolabilité, la solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,45 $\mu$ m), puis elle sera incorporée au milieu YMA autoclavé (à 120 °C pendant 20 minutes) et maintenu à 45 °C.

### **3.1.3. Activité cellulolytique**

Les isolats sont mis en culture sur milieu YMA auquel il a été rajouté préalablement le CMC (Carboxy Methyl Cellulose) à une concentration égale à 0,25 %, puis incubés à 28 °C pendant cinq jours. Après cette période, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et ré-incubées pendant 30 minutes à 28 °C.

Ensuite, la solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1M. Les boîtes sont laissées pendant 30 minutes à température ambiante puis vidées.

### **3.1.4. Recherche de l'oxydase**

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral (Camille ,2006).

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, une colonie est déposée sur des disques imprégnés du réactif oxalate de N-diméthyle paraphénylène-diamine de couleur rose. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive (Abdlhafid ,2011).

### **3.1.5. Recherche de catalase**

Une quantité suffisante de culture est prélevée et elle est mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. En présence des bactéries productrice d'une catalase, on observe immédiatement à partir d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 V une apparition de bulles, un dégagement gazeux de dioxygène, ce qui traduit une réaction positive et le contraire est valable.

### **3.1.6. Identification biochimique par la Galerie API 20 NE**

API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetonacter*, *Flavobacteruim*, *moraxelle*, *vibrio*, *aeromonas*, etc.) Combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système et possible d'identifier avec ce système et présente dans le tableau d'identification en fin de notice.

La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (Figure 12).

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Annexe04).



**Figure 12 :** mode d'emploi sur les galeries.

### **3.2. Test physiologique (Effet de la température)**

Afin de déterminer les températures optimales et maximales de croissance, les isolats sont ensemencés sur le milieu YMA (Annexe 01) par la méthode des stries simples puis incubées pendant 72 heures à températures différentes : 4 °C, 28 °C, 37 °C, 50 °C. Durant cette période, une lecture quotidienne des boîtes va permettre un meilleur suivi de la croissance. Pour la température 4 °C et 50 °C l'incubation peut aller jusqu'à cinq jours.

***Chapitre 03 :***  
***Résultats***  
***Et***  
***Discussion***

## 1. Isolement des bactéries à partir des nodules

### 1.1. Test de stérilisation

Après la durée d'incubation préconisée, le test est positive car il n'y a pas de croissance sur le milieu YMA + RC. L'absence de colonies sur ces boites a confirmé donc la bonne stérilisation de la surface nodulaire (Figure 13).

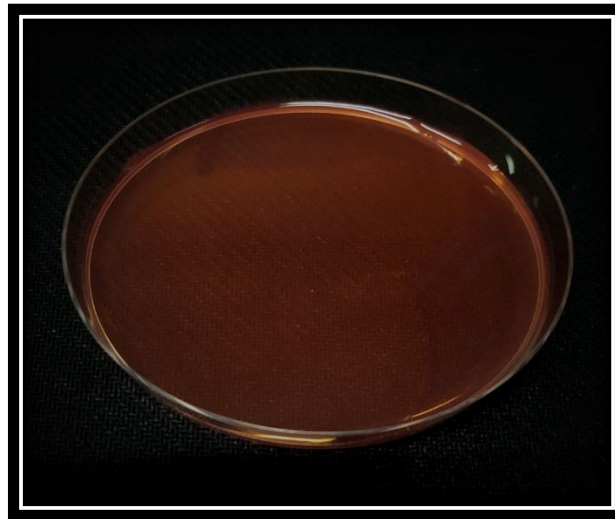


Figure 13 : Résultat du test de stérilisation.

## 2. Caractères cultureux

### 2.1. Purification des isolats

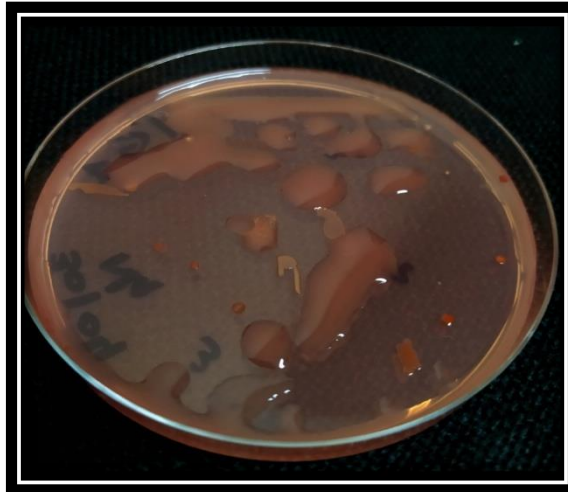
Après la culture des extraits des différents nodules, on est parvenue à isoler et à purifier 15 isolats puisqu'ils répondent à la description des *Rhizobium* établie par Vincent (1970) et Jordan (1984) en absorbant pas (ou peu) le rouge Congo. Les isolats pris en comptes codés comme suit :

TG<sub>1</sub>; TG<sub>2</sub>; TG<sub>3</sub>; TG<sub>4</sub>; TG<sub>5</sub>; TG<sub>6</sub>; TG<sub>7</sub>; TG<sub>8</sub>; TG<sub>9</sub>; TG<sub>10</sub>; TG<sub>11</sub>; TG<sub>12</sub>; TG<sub>13</sub>; TG<sub>14</sub>; TG<sub>15</sub> ont fait l'objet d'une coloration de Gram pour confirmer la pureté des cultures.

### 2.2. L'examen visuel des colonies

#### 2.2.1. Croissance sur milieu YMA + Rouge Congo

La croissance des isolats sur le milieu YMA (Yeast mannitol Agar) additionné de rouge de Congo était observée clairement après 48 heures d'incubation, où on a noté des colonies lisses, visqueuses, de couleur rose claire (Figure14).



**Figure 14:** Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur YMA+RC.

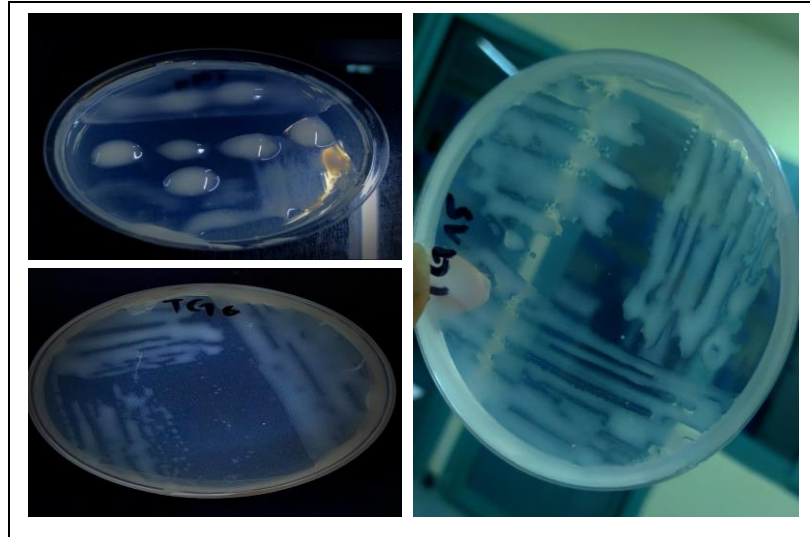
Généralement les rhizobiums produisent des colonies blanches ou absorbent un peu de Rouge Congo sur le milieu YMA-RC (Somasegaran et Hoben, 1994).

Nos résultats sont identiques avec les résultats de Bendaira et Felten (2019); Dekdouk et Ziada en 2015 avec *Trigonella gladiata* Stev.

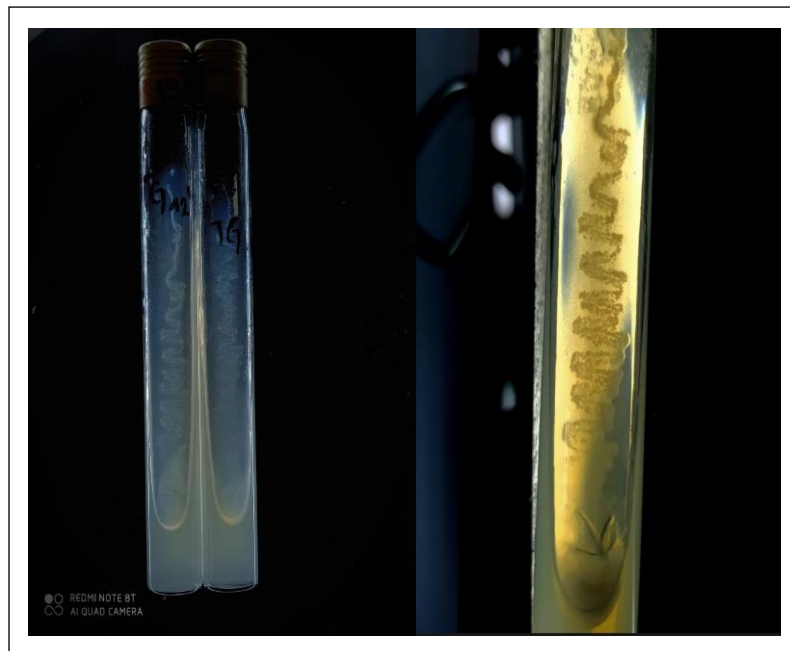
D'autre part les mêmes résultats sont observés par Fuskhah et al (2019) avec les rhizobiums isolés de soja, arachide, haricot vert et haricot long. Ces colonies sont blanches, incolores ou très légèrement roses. Kajić et al (2019) ont également observés des colonies blanchâtres ou roses pâles des rhizobiums, nodulant *Vigna unguiculata* L. et *Medicago sativa* L.

### 2.2.2. Croissance sur milieu YMA

Au bout de 48 h d'incubation à 28 °C sur le milieu YMA, Les colonie présentent un contour régulier, une forme circulaire mesurant entre 2 et 5 mm, de couleur blanche translucide, avec aspect lisse muqueux dû à la production des « Exopolysaccharides » (EPS) (Figure 15).



**Figure 15:** Aspect visqueux des isolats sur YMA.



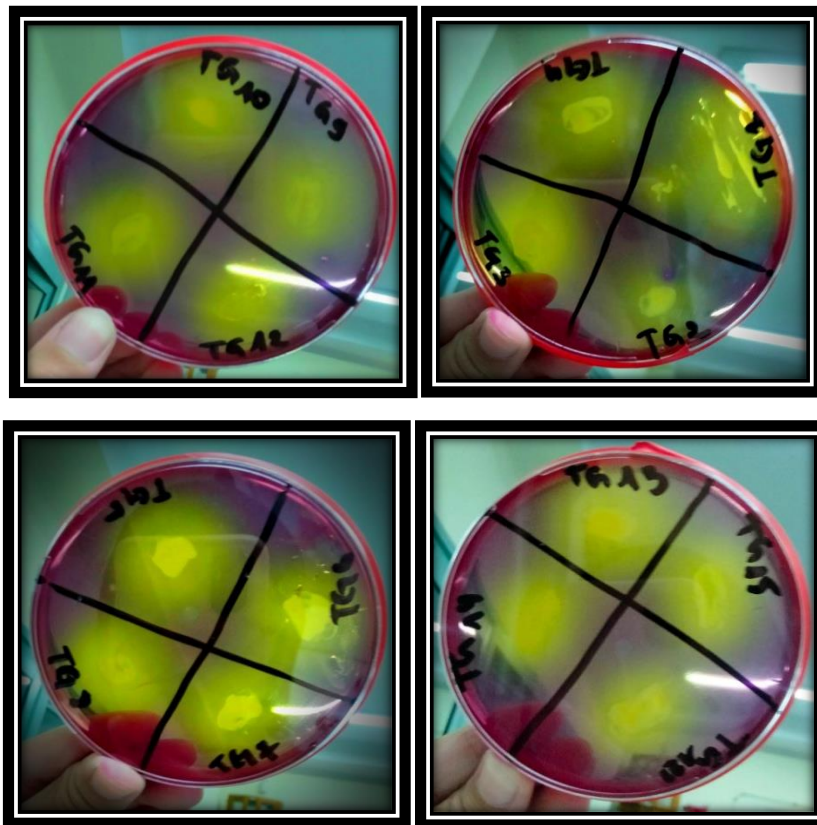
**Figure 16:** Résultats après la conservation des isolats sur YMA+CaCO<sub>3</sub> (tube incliné).



### 2.1.3. Croissance sur milieu GPA + BCP

Le pourpre de Bromocrésole (BCP) est un indicateur de pH, En présence de croissance, sa couleur vire vers le jaune dans le cas d'une acidification et vers le violet foncé lors d'une alcalisation.

Après 3 jours d'incubation à 28 °C, Tous les isolats ont montré une bonne croissance avec acidification du milieu (couleur jaune), ceci met en évidence leur capacité à assimiler le Glucose comme source de carbone, ce qui est en accord avec les travaux de Singh et son équipe publiés en 2008 portant sur l'isolement des *Rhizobium* nodulant la *Trigonella foenum-graecum* (Figure 17).



**Figure 17:** Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur GPA + BCP.

## 2.2. Test de la vitesse de croissance

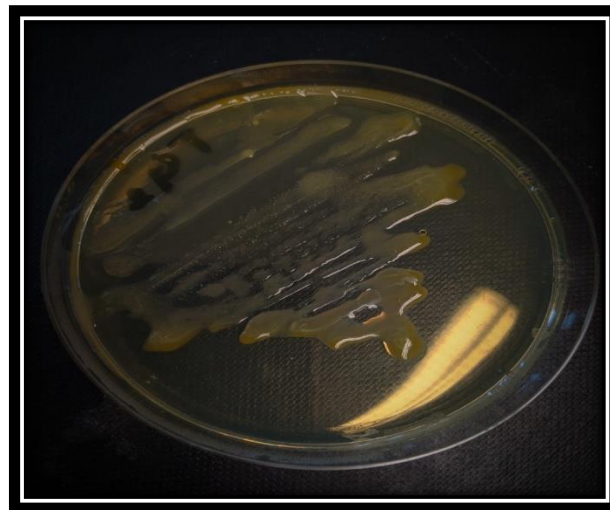
Le bleu de bromothymol (BTB) est un indicateur de pH permettant la mise en évidence d'une réaction acide ou basique dans une gamme, Une réaction acide se traduit par le changement de couleur du bleu vers le jaune, par contre la réaction basique se montre par le renforcement de la couleur bleu.

Dans la première édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology publiée en 1984, Jordan a subdivisé les rhizobiums en deux genres distincts:

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

Au bout de 72 heures d'incubation à 28 °C Sur le milieu YMA+ BTB, la totalité de nos isolats a présenté une coloration jaune, qui est due à une acidification totale du milieu de culture (Figure 18). Cela signifie que la croissance des différents isolats est rapide.

Des résultats similaires ont été rapportés par Kumar et *al* (2018) pour les bactéries isolées de *Trigonella foenum graecum* et par Boukaous (2020) pour les souches isolées à partir des nodules *Hedysarum pallidum*. La même constatation est rapportée par Gaci (2021) pour les rhizobiums indigènes piégés à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L.



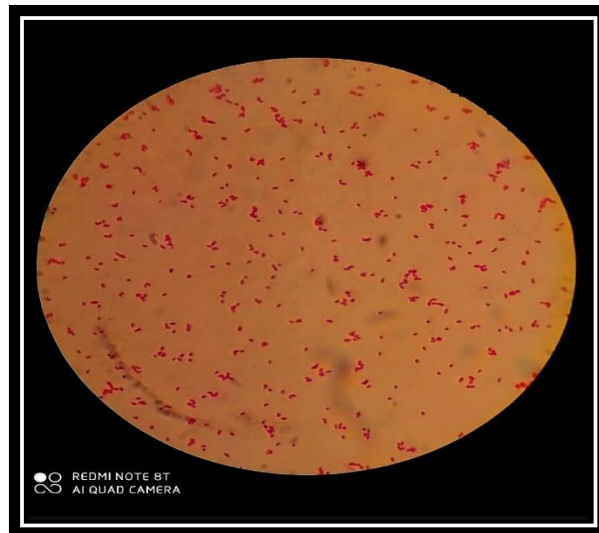
**Figure 18:** Résultat du test de vitesse de croissance YMA+BTB.

### 2.3. Examen microscopique après coloration de Gram

L'observation microscopique des isolats après la coloration de Gram, montre que nos isolats sont des coccobacilles courts, roses qui indiquent que les isolats sont des Gram négatif (Figure 19).

Généralement, Les rhizobiums sont des bacilles à Gram négatif, strictement aérobies et non sporulants, leur taille varie entre 0,6 à 0,9  $\mu\text{m}$  de largeur et de 1,2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur, mobiles avec une flagellation (Werner, 1992).

Ces résultats sont en accord avec la description donnée pour le genre *Bradyrhizobium* isolés par Vinuesa et *al* (2005), Dekak (2018) avec quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des *Ginesteae* (*Fabaceae*) et les isolats de Luzerne (*Medicago sativa*) par Saidi (2021).



**Figure 19:** Résultat de la coloration de Gram (Objectif x100).

### 3. Examen de la mobilité

Après une piqûre centrale par une pipette pasteur contenant une suspension bactérienne dans un tube de Mannitol mobilité incubé à 28 °C pendant 72 h. Tous les résultats sont positives (mannitol+ / Mobilité+) (tableau 01), on observe un changement de couleur du rouge vers le jaune avec une diffusion d'un trouble homogène au centre du milieu dans tous les tubes. Donc tous les isolats sont mobiles avec une acidification du milieu ce qui indique une fermentation du mannitol (Figure 20).

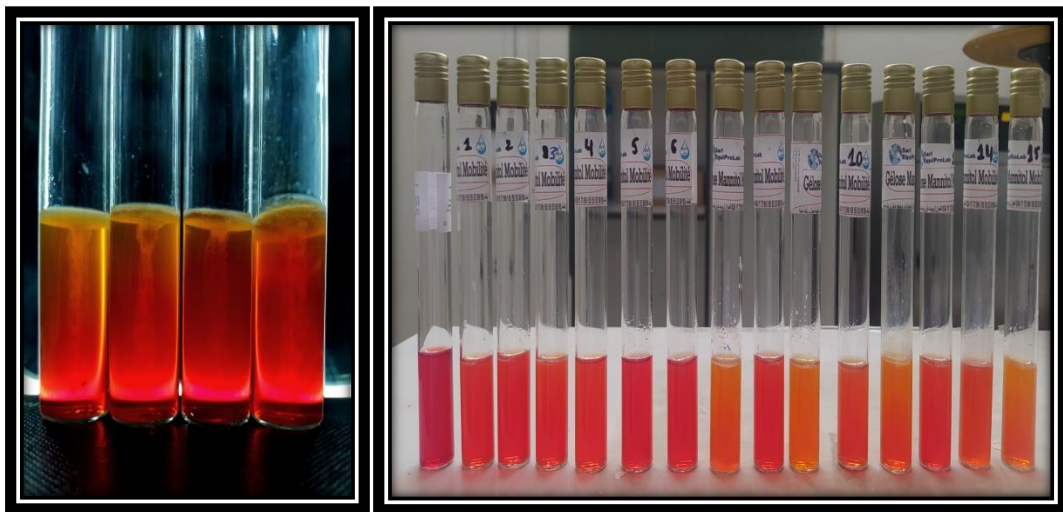


Figure 20: Résultats de Mannitol mobilité.

Ces résultats sont confirmés par Chabbi (2010), ainsi chez les bactéries nodulants *la fève* (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) Mouafek (2010) et Abdhahfid (2011), aussi chez les bactéries nodulants la légumineuse *Astragalus mareoticus* (Chemmare, 2014).

**Tableau 01:** Résultat du test mannitol mobilité.

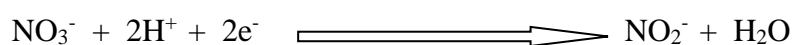
Les isolats	L'observation	L'interprétation	conclusion	
TG <sub>1</sub> TG <sub>7</sub> TG <sub>9</sub> TG <sub>11</sub>	Jaune	- Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide.	-La bactérie fermente le mannitol <b>Bactérie mannitol+</b>	
TG <sub>13</sub> TG <sub>14</sub> TG <sub>15</sub>		- Déplacement des bactéries dans le milieu (gélose semi-molle).	- Les bactéries sont mobiles <b>Mobilité +</b>	
TG <sub>2</sub> TG <sub>3</sub> TG <sub>4</sub> TG <sub>5</sub>		Jaune-orangé	- Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide.	-La bactérie fermente le mannitol <b>Bactéries mannitol+</b>
TG <sub>6</sub> TG <sub>8</sub> TG <sub>10</sub> TG <sub>12</sub>			- Déplacement des bactéries dans le milieu (gélose semi-molle).	-Les bactéries sont mobiles <b>Mobilité +</b>

#### 4. Caractéristiques phénotypique des isolats

##### 4.1. Tests biochimiques (la recherche des enzymes spécifiques)

##### 4.1.1. Réduction des nitrates

Dans le sol, l'azote est présent principalement sous forme d'ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et sous formes d'oxydes d'azote, ions nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur plantes hôtes. Le nitrate est réduit en nitrite par le nitrate réductase (NR) qui catalyse la réaction suivante :

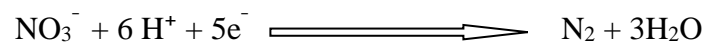


Après l'ajout de quelques gouttes des deux réactifs nitrate-réductase I et II, les deux isolats TG<sub>12</sub> et TG<sub>13</sub> (12.5 %) ont présenté une coloration rouge (résultat positive), ce qui

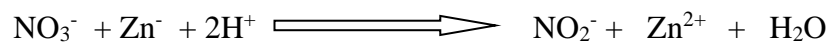
signifie qu'ils possèdent l'enzyme (Nitrate réductase NR+) et qu'ils ont réduit les nitrates en nitrites (Figure 21).

Les autres isolats n'ayant montré aucun changement de couleur, ont fait l'objet d'ajout de poudre de zinc :

- TG<sub>1</sub> TG<sub>2</sub> TG<sub>10</sub> TG<sub>14</sub> (25 %) sont restés incolores (résultat positive) (Figure 21-b), qui signifie que pas de présence de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> issus des NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ce dernier été réduits en N<sub>2</sub> par la bactérie (Nitrate réductase NR+ stade N<sub>2</sub>) ce processus est dit dénitrification selon :



- TG<sub>3</sub> ; TG<sub>4</sub> ; TG<sub>5</sub> ; TG<sub>6</sub> ; TG<sub>7</sub> ; TG<sub>8</sub> ; TG<sub>9</sub> ; TG<sub>11</sub> ; TG<sub>15</sub> (62.5 %) ont présenté une coloration rouge (résultat négative) (Figure 21-a), Qui signifie que le Zn a réduit le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> encore présents en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> qui sont révélés par les réactifs, pas de réduction de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en N<sub>2</sub> (Nitrate réductase NR-) selon la réaction suivante:



**Figure 21:** Résultat du test de la Nitrate-réductase.

L'activité de la nitrate réductase est positive pour 75 % de nos isolats. La capacité des rhizobiums à réduire les nitrates a été observée par Dekak et *al.*, (2018) 100 % des bactéries isolées des deux légumineuses *Genista microcephala* et *Argyrolobium uniflorum*,

ainsi que chez 100 % pour les rhizobiums de la légumineuse *Pisum sativum* L. de l'ITGC-Constantine et d'El Hassi (Gaci et al., 2021). Chez 93 % des bactéries isolées à partir des nodules d'*Hedysarum pallidum* (Boukaous et al., 2020).

D'autre part, Luciński et al. (2002) ont indiqué que les associations symbiotiques des souches de *Rhizobium* caractérisées par une forte activité du nitrate réductase. De plus, les études menées sur des souches différentes de *Bradyrhizobium* ont prouvé que les souches dotées cette enzyme (NR<sup>+</sup>), sont capables d'infecter suffisamment les racines, même à des concentrations relativement élevées en nitrate, alors que chez les souches qui en sont dépourvues (NR<sup>-</sup>) cette propriété est complètement perdue.

#### 4.1.2. Hydrolyse de l'urée

Les résultats ont révélé que 100 % des isolats sont positifs pour l'activité uréase (Figure 22). Nos isolats sont utilisés le rouge de phénol comme indicateur de pH. Ce dernier change de couleur vers le rose fuchsia suite à une activité hydrolytique de l'urée « CO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> » dont le produit est l'ammonium (NH<sub>3</sub>), ce dernier provoque une augmentation de pH (alcalinisation du milieu) selon la réaction suivante :

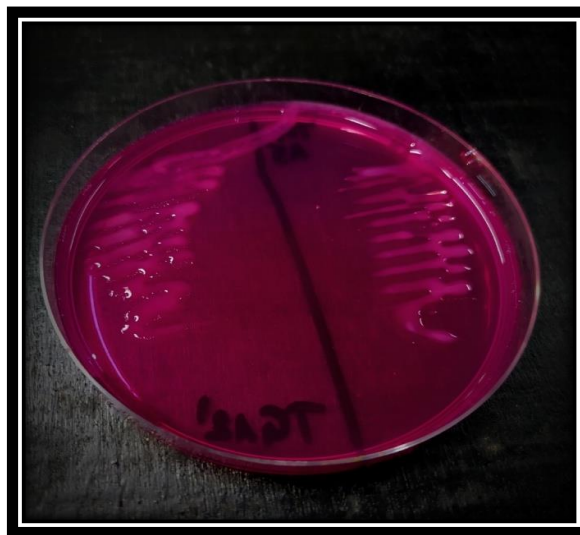
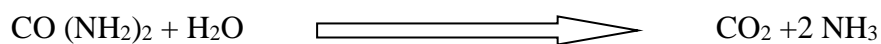


Figure 22 : Résultat de l'hydrolyse de l'urée.

La mise en évidence de la capacité des *rhizobia* à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et al. (1977). Beaucoup de travaux ont confirmé l'effet positive pour l'activité uréasique, (Dekak et al., 2018) avec les isolats nodulaires de *Genista microcephala*

et *Argyrolobium uniflorum*, la plupart des isolats de *Trigonella foenum-graecum* (Kumar et al., 2018). D'autre part, la capacité d'hydrolyse de l'urée par les bactéries nodulant les légumineuses pas toujours positive avec tous les souches, Gaci (2021) 52,94 % des isolats de la légumineuse *Pisum sativum* L. ,70 % des rhizobiums nodulant la luzerne (Kajić et al., 2019).

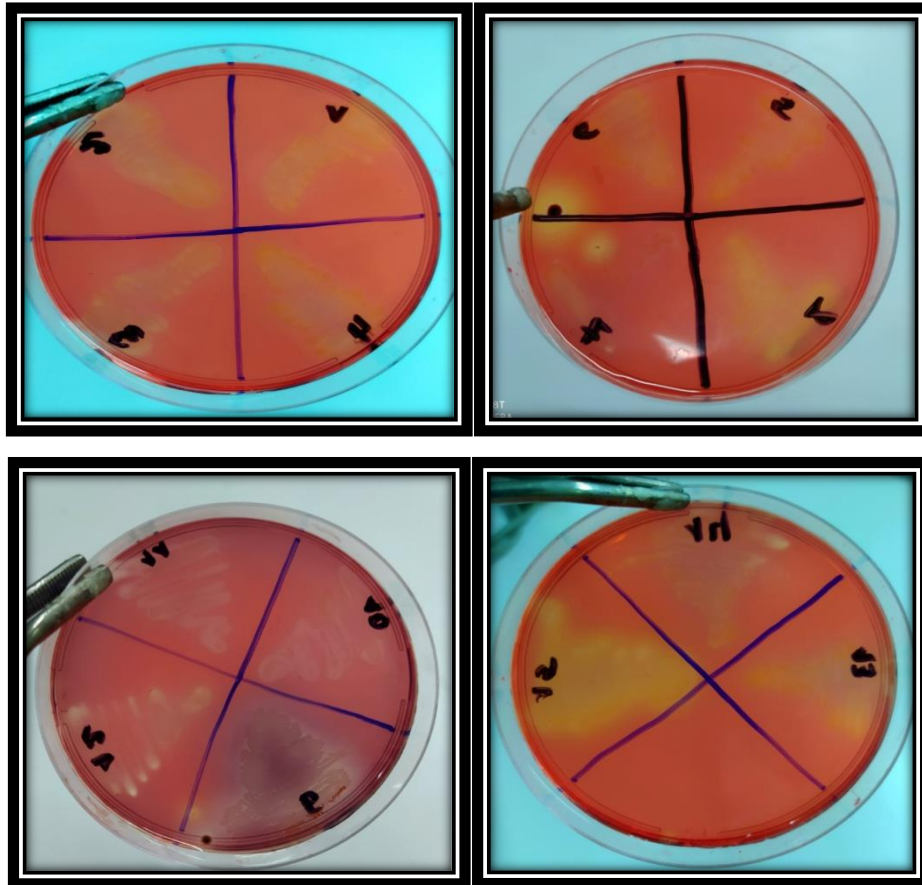
#### **4.1.3.           Activité cellulolytique**

La première phase du processus d'infection des légumineuses par les rhizobiums implique la dégradation enzymatique localisée des parois cellulaires aux extrémités des poils racinaires (Menéndez et al., 2019). Plusieurs études ont montré que les rhizobiums produisent des enzymes, comme la carboxyméthylcellulase (CMCase), également appelée « endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase ; EC 3.2.1.4 » capable de cliver les liaisons  $\beta$ -1,4-glucane des parois végétales et permettant la pénétration des bactéries (Menéndez et al., 2015),

L'apparissent des colonies sur un fond rouge avec un halo jaune orangé, prouve la présence d'une CMCase est l'une des enzymes clés impliquées dans le processus précoce de la symbiose (stade initial de l'infection) (Bhat et Bhat, 1997).

Tous les isolats ont montré une réaction positive (Figure 23). Ils sont donc capables d'hydrolyser le CMC.





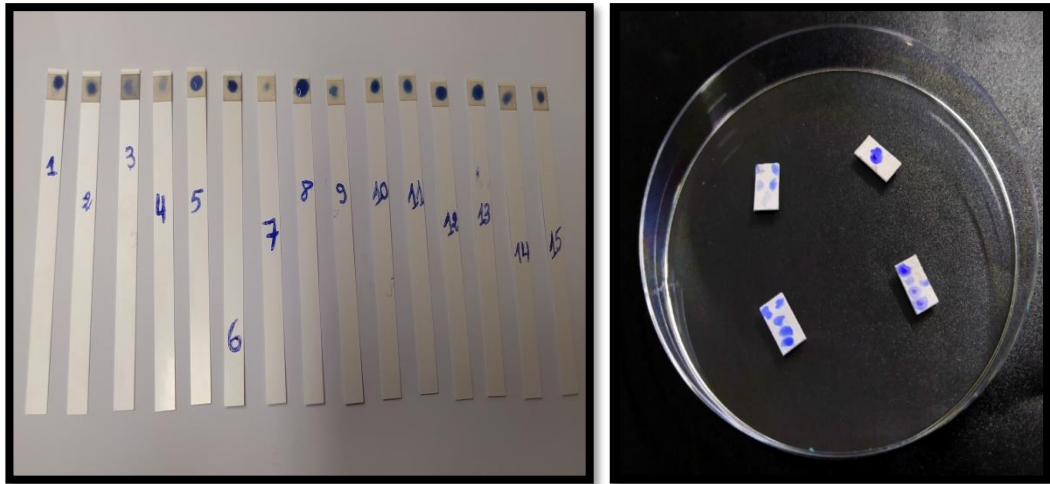
**Figure 23:** Résultat de l'hydrolyse du CMC.

Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec les résultats obtenus avec les bactéries isolées à partir des nodules de *Genista microcephala* et *Argyrobium uniflorum* (Dekak et al., 2018) et ainsi avec des isolats nodulaires d'*Hedysarum pallidum* (Boukaous et al., 2020) et avec 24 souches de *Mesorhizobium sp.* isolés à partir des nodules racinaires de *Cicer canariense* (Menéndez et al., 2020).

#### 4.1.4. Recherche de l'oxydase

L'enzyme de la bactérie oxyde le réactif N, N, N', N'-Tetraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride pour former un composé violet, l'indophénol (Bibirou, 2016).

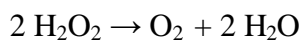
L'activité oxydase est positive pour tous nos isolats suite à l'observation immédiate d'une teinte bleue foncée (Figure 24), C'est-à-dire que ces bactéries possèdent une enzyme cytochromique bactérienne dans la chaîne respiratoire



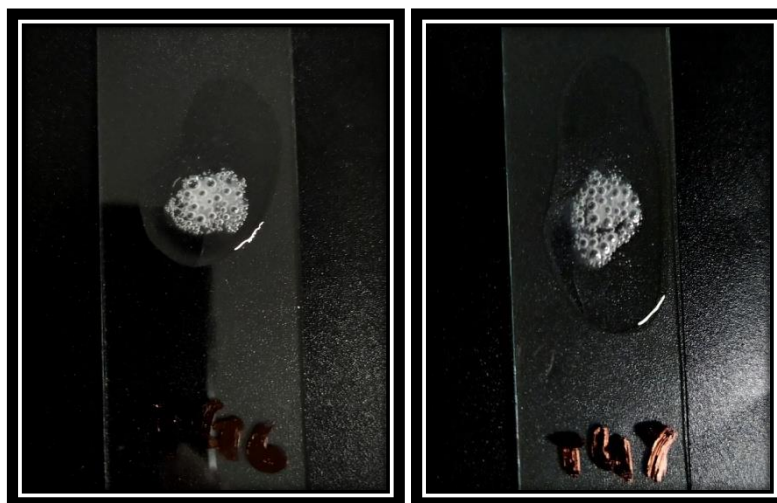
**Figure 24:** Résultat du test Oxydase.

#### 4.1.5. Recherche du catalase

La catalase est une enzyme catalysant la libération d'oxygène du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) selon la réaction suivante :



Lors de la mise en contact des isolats avec le  $H_2O_2$ , on observe que tous les isolats donne des résultats positif traduit par un dégagement des bulles d'air sur la lame issu de la dégradation de l'eau oxygénée, ce qui signifie qu'il possède cette enzyme (Catalase +) (Figure 25) Donc nos isolat sont des aérobies stricts. Ce qui en accord avec les travaux de (Abdlhafid ,2011).



**Figure 25:** Résultat du test Catalase.

**4.2. Caractérisation biochimiques sur galerie API 20 NE**

Les résultats obtenus des galeries API 20NE (Figure 26) sont présentés dans le tableau 02 qui va suivre. Ce test a été réalisé dans le but de pouvoir déterminer la source carbonée assimilée, ainsi que les autres caractéristiques des différentes souches étudiées, c'est une base de l'identification biochimique.

**Tableau 02 : Résultats des tests biochimiques effectués sur la galerie API 20 NE.**

souche test	TG 1	TG <sub>2</sub>	TG 3	TG 4	TG 5	TG 6	TG 7	TG 8	TG 9	TG <sub>10</sub>	TG <sub>11</sub>	TG <sub>12</sub>	TG <sub>13</sub>	TG <sub>1</sub> 4	TG <sub>15</sub>
NO <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
TRP	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
URE	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PNPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
MNE	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+

MAN	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
GNT	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
CAP	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ADI	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
MLT	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
CIT	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Test positif

;

- : Test négatif

❖ **Les tests onventionnels (Tableau 02)**

• **L'utilisation du tryptophane (TRP)**

Les résultats obtenus montrent que les souches TG<sub>1</sub>, TG<sub>2</sub>, TG<sub>3</sub>, TG<sub>5</sub>, TG<sub>6</sub>, TG<sub>8</sub>, TG<sub>14</sub>, TG<sub>15</sub> étudiées produisent de l'indole à partir du tryptophane.

• **Fermentation du glucose (GLU)**

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches n'est pas capable de fermenter le glucose.

- **L'hydrolyse de l'arginine (ADH)**

Les résultats obtenus montrent que les souches TG<sub>1</sub>, TG<sub>2</sub>, TG<sub>3</sub>, TG<sub>4</sub>, TG<sub>5</sub>, TG<sub>6</sub>, TG<sub>8</sub>, TG<sub>10</sub>, TG<sub>13</sub>, TG<sub>14</sub>, TG<sub>15</sub> qui sont capables d'hydrolyser la L-arginine.

- **L'hydrolyse de l'urée (URE)**

Les résultats obtenus montrent que les souches TG<sub>1</sub>, TG<sub>2</sub>, TG<sub>3</sub>, TG<sub>4</sub>, TG<sub>5</sub>, TG<sub>6</sub>, TG<sub>8</sub>, TG<sub>13</sub>, TG<sub>14</sub> et TG<sub>15</sub> possèdent une uréase alors que les autres en sont dépourvu.

- **L'hydrolyse de l'esculine (ESC)**

Toutes les souches sont capables d'hydrolyser l'esculine.

- **L'hydrolyse de la gélatine (GEL)**

Les résultats obtenus montrent que la seule souche TG<sub>11</sub> est capables d'hydrolyser la gélatine.

- **Activité β-D galactopyranoside (PNPG)**

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches possèdent une β-galactosidase sauf la souche TG<sub>11</sub>.

- ❖ **Les tests d'assimilation**

Les tests d'assimilation montrent que parmi les différents substrats utilisés :

- TG<sub>1</sub>, TG<sub>4</sub>, TG<sub>13</sub>, TG<sub>14</sub> assimile le citrate trisodium alors que les autres souches n'assimilent pas le citrate.

- TG<sub>7</sub>, TG<sub>10</sub>, TG<sub>11</sub>, TG<sub>12</sub>, TG<sub>15</sub> quant à elles n'assimilent pas l'acide malique et le citrate trisodium.

- La souche TG<sub>4</sub>, TG<sub>14</sub> assimile phenylacetic acid et capric acid alors que la souche TG<sub>7</sub>, TG<sub>9</sub>, TG<sub>10</sub>, TG<sub>11</sub>, TG<sub>12</sub> n'assimile pas le maltose.

- Les souches TG<sub>1</sub>, TG<sub>2</sub>, TG<sub>3</sub>, TG<sub>4</sub>, TG<sub>5</sub>, TG<sub>6</sub>, TG<sub>8</sub>, TG<sub>13</sub>, TG<sub>14</sub>, TG<sub>15</sub> assimile D-mannitol N-acetyl-glucosamine et D-maltose et potassium gluconate.

- Les souches TG<sub>1</sub>, TG<sub>2</sub>, TG<sub>3</sub>, TG<sub>4</sub>, TG<sub>5</sub>, TG<sub>6</sub>, TG<sub>8</sub>, TG<sub>14</sub>, TG<sub>15</sub> assimile D-glucose et L-arabinose.

- Sauf la souche assimile TG<sub>11</sub> D-glucose et la souche TG<sub>13</sub> assimile L-arabinose.

Niste et ses collaborateurs (2015), ont utilisé le système d'identification biochimique API 20NE sur une collection de 20 isolats nodulaire à partir de *Trifolium pratense* et *Medicago sativa*.

Ils ont constaté une diversité dans l'utilisation des carbohydrates chez les Rhizobia et rapporte que ce résultat confirme d'autre travaux antérieurs. Cette diversité renseigne sur une variabilité de l'équipement enzymatique.



Figure 26 : résultats des tests biochimiques sur les galeries api 20NE.

**5. Tests physiologiques**

➤ **Effet de la température**

Nos isolats présentent une bonne croissance entre 28 °C et 37 °C après 48 heures d'incubation (Tableau 03). Aux températures extrêmes, la croissance des souches est fortement influencée, la faible intensité de la croissance est prononcée et elle s'arrête complètement chez la plus part des isolats à une température de 50 °C.

Par contre à 4 °C, on a noté que certains isolats présentaient une croissance au bout des premières 72 heures suivant l'inoculation, alors que d'autres en sont Inhibés jusqu'au dernier jour d'incubation (5ème jour) (Figure 27).

**Tableau 03** : Croissance des isolats aux différentes températures.

T (°C) \ Isolats	4 °C	28 °C	37 °C	50 °C
TG <sub>1</sub>	+ (48h)	+ ++ (48 h)	+ + + (24 h)	-
TG <sub>2</sub>	+ (72 h)	+ + (72 h)	+ + + (48h)	-
TG <sub>3</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + + (24 h)	+ (72h)
TG <sub>4</sub>	+ (48 h)	+ + + (48 h)	+ + (48 h)	-
TG <sub>5</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + (48 h)	-
TG <sub>6</sub>	+ (72 h)	+ + (72 h)	+ + + (24 h)	+ (72 h)
TG <sub>7</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + (48 h)	-
TG <sub>8</sub>	+ (48 h)	+ + (48 h)	+ + + (48 h)	-
TG <sub>9</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + + (48 h)	-
TG <sub>10</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + + (24 h)	-
TG <sub>11</sub>	+ (48 h)	+ + + (48 h)	+ + + (24 h)	-
TG <sub>12</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + + (48 h)	-
TG <sub>13</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + + (24 h)	-
TG <sub>14</sub>	+ (48 h)	+ + + (48 h)	+ + + (24 h)	-
TG <sub>15</sub>	+ (72 h)	+ + + (48 h)	+ + (48 h)	+ (72h)

+++ : Très bonne croissance. ; ++ : Bonne croissance. ;

+ : Faible croissance. ; - : Pas de croissance

Graham (1992) a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10 °C et 37 °C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28 °C. Cependant, beaucoup d'études ont prouvé la capacité des rhizobiums à tolérer les températures élevées grâce à des Heat Shock Proteins (HSPs) qui jouent un rôle important dans la protection des organismes contre le stress thermique (Michiels *et al.*, 1994 ; Wallington et Lund, 1994).

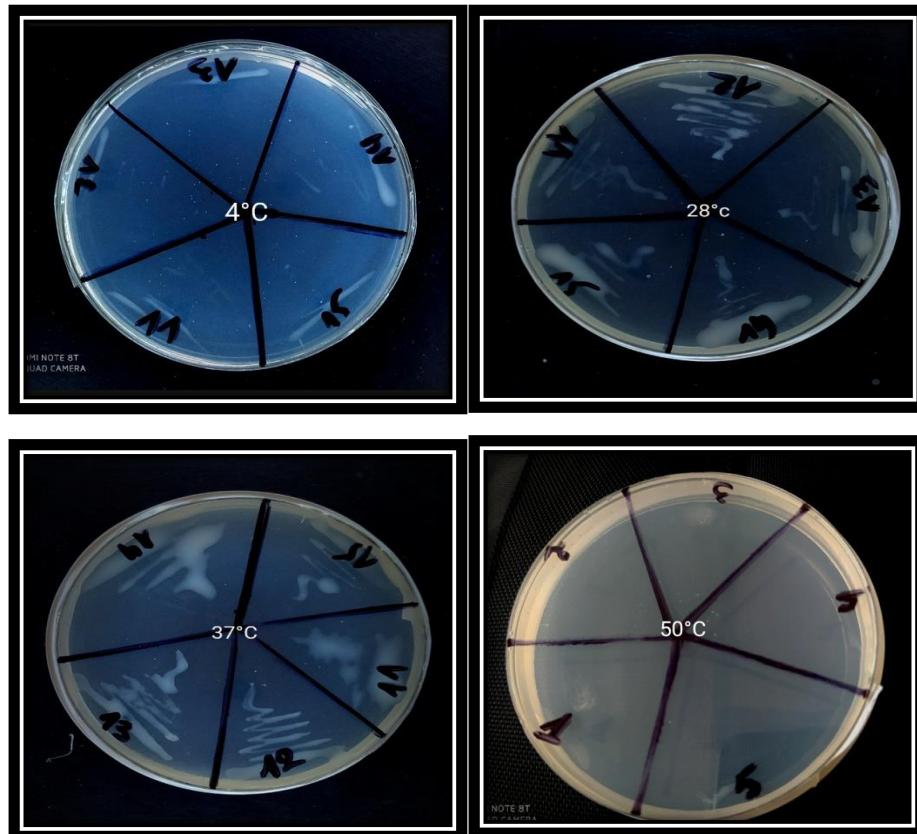
D'autre part, il a été rapporté que les températures élevées peuvent également avoir un impact sur la persistance des rhizobia dans l'inoculum durant son stockage, leur survie dans le sol ainsi que durant la nodulation et la fixation d'azote (Graham, 1992).

En effet, les températures élevées affectent la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). À l'opposé, les températures basses inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang *et al.*, 1996).

D'autre côté, les basses températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les rhizobia dans les régions très humides ou froides (Zhang et Smith, 1996).

Il a été aussi démontré qu'aucune corrélation n'existait entre les températures du site d'isolement et la capacité des bactéries à tolérer des éventuels stress thermiques (El Hilali, 2006), ce qui exclue toute relation entre les températures enregistrées à la wilaya de Khenchela (une moyenne des minima de - 2 °C et un minima absolu de - 4,8 °C (Andi, 2015) et la capacité de nos isolats à croître à basse température.





**Figure 27:** Croissance de certains isolats à différentes températures  
Après 48 heures

***Conclusion***

Dans cette étude nous avons essayées d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev., collectée de la région de Trachet, commune d'El Mahmel à la Wilaya de Khenchela située à l'Est Algérien.

D'après ce travail nous avons essayé de déterminer les caractères phénotypiques de quinze souches isolées, cette caractérisation comporte des caractères culturels dépendant des différents milieux (YMA, YMA+RC, YMA+BTB, YMA+BCP, examen microscopique, examen mobilité) ainsi des tests biochimiques (réduction des nitrates, hydrolyse de l'urée, activité cellulolytique, test d'oxydase, test catalase, la galerie api 20NE) et des tests physiologiques (effet de la température).

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure ce qui suit :

Les quinze isolats à un aspect morphologique colonial lisses, muqueuses, de couleur blanchâtre sur le milieu YMA, avec une faible ou sans absorption du rouge Congo sur milieu YMA+RC, les isolats acidifier le milieu GPA et ont une croissance rapide sur le milieu YMA+BTB.

L'examen microscopique par coloration de Gram révèle des coccobacilles courts à Gram négatif de différentes tailles. Le résultat du test mannitol mobilité confirme la mobilité des isolats avec sa capacité à utiliser le mannitol comme source de carbone.

L'identification biochimique basée sur la recherche des enzymes spécifiques nécessaires à la relation symbiotique. Malheureusement la majorité des souches ne sont pas pourvues d'un nitrate réductase. D'autre part, tous les isolats possèdent des enzymes nécessaires au processus d'infection (cellulase) et au métabolisme azoté (uréase), ainsi tous les isolats présente une réaction positive pour l'oxydase et au maintien de l'état physiologique fonctionnel à l'exception de la catalase qui est positive pour la totalité.

L'étude biochimique sur les galeries API 20NE a montré une grande diversité des caractères traduisant une variabilité de l'équipement enzymatique et du potentiel d'assimilation des substrats organiques.

La caractérisation physiologique de ces isolats a permis la mise en évidence d'un caractère mésophile avec un optimum de croissance entre 28 °C et 37 °C.

A la lumière de ce qui a été rapporté ci-dessus, on peut conclure que toutes les réponses morphologiques, physiologiques et biochimiques de nos isolats sont similaires à celles des BNL et des rhizobia. Mais ces résultats insuffisants en doivent être suivé par d'autres tests d'identification complémentaires, tel que le test de nodulation ainsi que les tests génotypiques, moléculaires et les tests physiologique.

Par conséquent, le champ reste ouvert pour de nouvelles études sur cette espèce. Nous espérons que les bactéries nodulant légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. deviendra identifié dans l'avenir.

***Références***  
***Bibliographique***

- **Abderrahim, S. et Imakhloufene, S. (2016).** Etude de la tolérance aux stress abiotiques de bactéries nodulant la féverole. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. p .67.
- **Abdlhafid, L. (2011).** Effet de certains indicateurs de gènes nod (composé phénoliques) sur la croissance de rhizobium en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique .en vues de l’obtention du diplôme de doctorat –sciences en biologie moléculaire et cellulaire, université ABoubaker belkaid .Telmcen, page 43.
- **Afzal, M., Khan, Q.M et Sessitisch, A. (2014).** Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117. 232-242.
- **Andi., (2015).** invest in Algeria : fiche descriptive de la wilaya de kenchla. p : 2-6
- **Andrews, M., Andrews, M.E. (2017).** Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 1(705), 1-39.
- **Andrews, M., De Meyer, S., James, E., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M., Young, J., (2018).** Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. *Genes* 9, 321.
- **Azani, N. ; Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., (2017).** «A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG) », *Taxon*, 66, 44-77.
- **Beck, D. P., Materon, L. A. et Afandi,F. (1993).** Rhizobiyum-Paractique vegetable. Manual technology. Syria: ICARDA. p: 290.
- **Beck, D.P., Materon, L. A. et Afandi, F. (1993).** Rhizobiyum-Paractique vegetable. Manual technology. Syria: ICARDA. p: 290.
- **Beijerinck, M.W. 1888.** Culture des Bacillus radicolaaus den Kno’llchen. *Bot Ztg.* 46: 740-750.
- **Bekakria, S., Hemaïdia, S.,Reghaïssia, N., (2019).** Etude de l’effet des facteurs abiotiques sur les bactéries nodulant les légumineuses. Mémoire pour Obtenir le Diplôme de Master. Université 8 Mai 1945 Guelma. p : 05.
- **Bendaira, Z. et Felten, S. (2019).** Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Mémoire pour obtenir le diplôme de master 2 Université Mantouri Constantine, Algérie. p : 29.

- **Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., et Squartini, A. (2004).** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 462–468.
- **Bhat, M. K., et Bhat, S. (1997).** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3–4), 583–620.
- **Bibirou .(2016)** : tests utilisés en bactériologie, biologie techniques de laboratoires pour laboratoire de brousse.
- **Boukaous, L., (2020).** Mise en évidence des Bactéries Nodulant les Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de l'Algérie. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat 3ème cycle. Université des Frères Mentouri Constantine 1. p:03 / 53.
- **boukaous, L., Ferjani, R., Mellal, H., Mimouni, W., Tir, R., Gaci, M., Cherni, M., Squartini, A., Ouzari, H. M. et Benhizia, Y. (2020).** Diversity of bacteria associated with root nodules of *Hedysarum pallidum* Desf. Growing in different regions of Algeria. *Asian Jr. of Microbiology, Biotechnology & Environmental sciences*. 22:217-227.
- **Boukhatem, Z.F. (2013).** Diversité Taxonomique et Symbiotique des rhizobia associés aux Acacia sp d'Algerie. Thèse de Doctorat, Microbiologie. Université d'Oran, p. 2.
- **Boukhiet, I. (2016).** L'effet des facteurs abiotiques sur le contenu Nodulaire d'une espèce fourragère *Hedysarum pallidum* Defs., poussant dans deux régions différentes. Mémoire de master : Ecologie Microbienne. Constantine. Université des Frères Mentouri.68p.
- **Bounaama, S., (2014).** Evaluation de l'amélioration de la fertilité des sols emblavés par une légumineuse fourragère en relation avec la symbiose rhizobium dans la région d'El Goléa. Mémoire d'Ingénieur. Dépôt institutionnel de l'université Kasdi Merbah. Ouargla. 78p.
- **Camille, D. (2006).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. 2ème édition, TEC et DOC, p.15.
- **Chabbi, R. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Thèse de Magistère, Université Mantouri Constantine, Algérie.

- **Chammer, W. (2014).** Caractérisation phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Astragalus mareoticus* (région Fontaine des gazelles, Biskra). Mémoire pour obtenir le diplôme Master 2. Université Mohamed Khider Biskra. p : 34.
- **Clúa, J., C. Roda, M. E. Zanetti et F. A. Blanco (2018).** Compatibility between legumes and Rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, **9** (125):1-21.
- **Coba De Le Pena, T., Fedorova E., Pueyo, J.J., Lucas, M.M., (2018).** *Frontiers in Plant Science*.
- **Dekak, A., (2018).** Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des *Ginesteae* (*Fabaceae*).Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine 1. p : 06.
- **Dekak, A., Chabbi, R., Menasria, T. et Benhizia, Y. (2018).** Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes. *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions *J. Adv. Res*, 14:35-42. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.001>.
- **Delarras, C. (2007).** 126-In. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. 172. DOC, EM inter, pp.
- **Franche, C., Lindstom, K., and Elmerich, C. (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321, (1-2), 35-59 (cité in boukaous en 2020).
- **Frank, B. (1889).** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges.* **7**: 332–346.
- **Fuskhah, E., Purbajanti, E. D. et Anwar, S. (2019).** Test of the resistance of rhizobium bacteria to salinity for the development of food legume plants in coastal areas. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 250:012044. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/250/1/012044>.
- **Gaci, M. (2021).** Identification des rhizobiums indigènes piégés à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L. en Algérie, par approche polyphasique. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine 1.p 88-98.



- **Gaci, M., Benhizia, Y., Dems, M. A., Boukaous, L. Benguedouar, A. et Hynes, M. F. (2021).** Phylogenetic diversity of indigenous *Rhizobium* trapped from the natural habitat of *Pisum sativum* L. in eastern and central Algeria. *Plant Soil* 461:369–388.
- **Giraud, E. (2007).** Symbiose rhizobium/légumineuse: un nouveau sésame. *Médecine / sciences*, 23(6-7), 663-666.
- **Graham, P.H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38: p: 475-484.
- **Henintsoa, M., (2013).** Disponibilité et dynamique du carbone, de l'azote et du phosphore sous association culturale Riz-Haricot soumise à différents types de fertilisation phosphatée apportée à dose croissante. Expérimentation agronomique de Lazaina sur sol ferrallitique de « tanety ». DEA, ESSA de l'université d'Antananarivo. 88 p.
- **Iskounen, T. (2012).** Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses *Calycotome spinosa*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. P 69.
- **Jarvis, B. D. W., Jarvis, B. D. W., Robertson, I. G. C., et Fanning, G. R. (1977).** Phenetic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and rhizobium strains from agricultural plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(2), 235–248.
- **Jarvis, B. D. W., Maclean, T. S., Robertson, I. G. C. et Fanning, G. R. (1977).** Phenetic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.*, 20:235-48.
- **Jordan, D.C. (1984).** Rhizobiaceae. In: Kreig, N R (ed) *Bergey's manual of systematic Bacteriology* 1: p: 234-256.
- **Jordan, D. C. (1984).** Family III *Rhizobiaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by NR Krieg and JG Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1, 234-254.
- **Julve, Ph., (2021).** ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 27 avril 2021. <https://www.tela-botanica.org/projets/phytosociologie>.
- **Kahindi, J. H. P., Woome, P., George, T., de Souza Moreira, F. M., Karanja, N. K. and Giller, K. E. (1997).** Agricultural intensification, soil biodiversity and

ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied soil ecology*, 6, 55-76.

- **Kajić, S., Komes, A., Rajnović, I. et Sikora, S. (2019).** Selection of stress tolerant indigenous rhizobia nodulating alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agric. Conspec. Sci.*, 84:365-370. <https://hrcak.srce.hr/228925>.

- **Koenen, E. J., Ojeda, D. I., Steeves, R., Migliore, J., Bakker, F. T., Wieringa, J. J., Kidner, J., Bakker, F.T., Wieringa, J.J., Kidner, C., Hardy, O.J., Pennington, R.T., Bruneau, B. and Hughes, C.E. (2020).** Large-scale genomic sequence data resolve the deepest divergences in the legume phylogeny and support a near-simultaneous evolutionary origin of all six subfamilies. *New Phytologist*, 225(3), 1355-1369.
- **Kouakou, R. (2011).** Diversité génétique des rhizobia associées à un champ de pois d'angole (*Cajanus cajan* L.) à Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire). Diplôme d'agronomie approfondie. École supérieure d'agronomie de l'Institut national polytechnique. p: 24
- **Kumar, H., Dubey, R. C. et Maheshwari, D. K. (2018).** Rhizobial genetic diversity in root nodules of *Trigonella foenum-graecum* cultivated in sub-himalayan region of Uttarakhand. *Biocatal. Agric Biotechnol.*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.011>.
- **Kumari, B.S., Ram, M.R., Mallaiah, K.V., (2010).** Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of *Rhizobium*. *Malay. J. Microbiol.* 6(2):133-139.
- **Lebbida, F. (2009).** Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières. de diplôme de Magister. Ecole nationale supérieure d'agronomie -El Harrache-Alger. 101p.
- **Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., et Chen, W. X. (2008).** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1409–1413.
- **Lindstrom, K., and Lehtomaki, S. (1988).** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fastgrowing rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 50(2–3), 277–287.
- **LPWG. (2017).** A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66 (1): p: 44–77.
- **Luciński, R., Polcyn, W. et Ratajczak, L. (2002).** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochim. Pol.*, 49:537-46.
- **MacLean, A.M., Finan, T.M. and Sadowsky, M.J. (2007).** Genomes of the symbiotic nitrogen fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 615-622.

- **Madigan, M. et J. Martinko (2007).** Brock, Biologie des microorganismes. 11e Edition. Person Education France. pp. 599-601, 676-681.
- **Menéndez, E., Garcia-fraile, P. et Rivas, R. (2015).** Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioengineering*, 2:163-182.
- **Menéndez, E., Martínez-hidalgo, P., Silva, L., Velazquez, E., Mateos, P. F. et Peix, A. (2017).** Recent advances in the active biomolecules involved in rhizobia-legume symbiosis. In: ZAIDI, A., KHAN, M. & MUSARRAT, J. (eds.) *Microbes for Legume Improvement*. Springer, Cham.
- **Menéndez, E., Pérez-yépez, J., Hernández, M., Rodríguez-pérez, A., Velázquez, E. et León-barrios, M. (2020).** Plant growth promotion abilities of phylogenetically diverse *Mesorhizobium* strains: Effect in the root colonization and development of tomato seedlings. *Microorganisms*, 8:412.
- **Menéndez, E., Robledo, M., Jiménez-zurdo, J. I., Velázquez, E., Rivas, R., Murray, J. D. et Mateos, P. F. (2019).** Legumes display common and host-specific responses to the rhizobial cellulase CelC<sub>2</sub> during primary symbiotic infection. *Sci. Rep.*, 9:13907.
- **Michiels, J., Verreth, C., Vanderleyden, J. (1994).** Effect of Temperature Stress on Bean Nodulating *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1206-1212.
- **Miloud, Y., (2018).** Etude du potentiel bénéfique des souches de *Rhizobium* pour *Medicago truncatula*: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose. Thèse pour obtenir le grade de docteur. University de Toulouse. p:27.
- **Mouafek, A. (2010).** La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra .Mémoire de magister, Sciences Agronomiques ,Université de Mohamed khider Biskra ,p 6 et 37 .
- **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.
- **Nelson, M. S. et M. J. Sadowsky (2015).** Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing Rhizobia and legumes. *Front. Plant Sci.*, 6 (491): 1-11.
- **Niste et ses collaborateurs, (2015).** Isolation and Biochemical Characterization of *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti* using API 20 NE and API 20 E.

- **Ott, T., Van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H. Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., Udvardi, M.K. (2005).** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*. 15 : p : 531–535.
- **Pagano, M.C. (2008).** Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, 2008 (11) p: 498–508.
- **Perrin, JF. (2019).** Assimilation du diazote.  
[http://www.perrin33.com/microbiologie/azote/entree-n\\_3.php](http://www.perrin33.com/microbiologie/azote/entree-n_3.php).
- **Pratt, C., Cornely, K., (2019).** Biochimie. Paris : DE BOECK Supérieur. p: 465.
- **Prescott, J., Harley J., Klein D., Willey, M., Sherwood, L. et Woolverton, C. (2010).** Microbiologie. Paris: de Boeck. p : 236 ; 237 ; 526 ; 704.
- **Prospero, S., Vercauteren, A., Heungens K., Belbahri. L., et D. Rigling (2013).** Phytophthora diversity and the population structure of *Phytophthora ramorum* in Swiss ornamental nurseries. *Plant Pathol.*, 62:1063–1071.
- **Pujic, P., Normand, P., (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*, (298), 26-29.
- **quandpartirpour.fr a été indexé pour la première fois par Google en August (2018)** [en ligne]. (page consulté le 16- 04 -2023)  
<https://www.quandpartirpour.fr/algerie/khenchela-97258/>
- **Quezel, P. et Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 tomes. Ed. C.N.R.S. Paris, p : 1170.
- **Radl, V., Simões-Araújo, J. L., Leite, J., Passos, S. R., Martins, L. M. V., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., Baldani, J. I., et Zilli, J. E. (2014).** *Microvirga vignae* sp. nov, a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(3), 725–730.
- **Rao, D. L. N., S. R. Mohanty, C. Acharya et N. Atoliya (2018).** Rhizobial Taxonomy - Current Status. *IUNFC Newsletter*, 3: 1-4.
- **Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., Kroppenstedt, R. M., Martínez-Molina, E., Gillis, M., et Velázquez, E. (2003).** Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. That nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 47–53.

- **Roba, M., (2016).** Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuse metalliocolles : effet des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobia symbiotique d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus*. Thèse pour obtenir le grade de docteur. University de Montpellier. p:11.
- **Saidi, S. (2021).** Amélioration de la symbiose *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa* après co-inoculation par des Actinobacteria. Effets bénéfiques sur les paramètres de croissance sous stress salin. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1. p 13.
- **Sawada, H., Kuykendall, L. D., et Young, J. M. (2003).** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. In. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, (3), 155–179.
- **Schneider, A. et Huyghe C. (2015).** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Paris : Quae. p: 81-136.
- **Selami, N. (2015).** Etude des associations symbiotique de *Retama monosperma* : approche morphologique, anatomique et ultra-structurale, caractérisation moléculaire des isolats. Université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf. p: 13.
- **Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., et Sadowsky, M. J. (2017).** Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis* , 71( 2), 91–109.
- **Sierra, J. et Tournebize, R. (2019).** Fixation symbiotique d'azote par les légumineuses en association. Résultats obtenus en Guadeloupe. (hal-02373208), p 12.
- **Somasegaran, P. et Hoben, H. J. (1994).** *Handbook for Rhizobia : Methods in Legumes-Rhizobium Technology*, Springer-Verlag New York.
- **Suty, L., (2015).** Les végétaux : des symbioses pour mieux vivre. France : QUAE. p: 20, 22.
- **Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., et Dreyfus, B. (2001).** Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 214–220.
- **Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z. ; et Luo, Y., (2015).** Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. In: *Frontiers in Plant Science*, P : 6 (FEB).

- **Terefework, Z. (2002).** Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Thesis of the University of Helsinki. 58p.
- **Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D., et Squartini, A. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. Sciences & Technologie. (32):43- 50.
- **Tortora, G.J., Funk, B.R. et Case, C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. Du renouveau. Inc. 826-830p.
- **Tourte, Y., Bordonneau, M., Henry, M., et Tourte, C. (2005).** Le monde des végétaux: organisation, physiologie et génomique. Dunod.
- **Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., et Velázquez, E. (2005).** Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology, 71(3), 1318–1327.
- **Vernie, T., (2008).** Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Médicago Truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat, université ToulouseIII-paul Sabatier, Toulouse .263p.
- **Vertes, F., Jeuffroy M.H., Justes E., Thiebeau P., et Corson M. (2010).** Connaître et maximiser les bénéfices environnementaux liés à l'azote chez les légumineuses, à l'échelle de la culture, de la rotation et de l'exploitation. Innovations agronomiques. 11(1): 25-4
- **Vincent, JM. (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.
- **Wallington, E.J, Lund, P.A. (1994).** *Rhizobium leguminosarum* Contains Multiples Chaperonain (cpn 60), *Genes.Microbiology*, 140,133-122.
- **Wang, L., Wang, L., Zhou, Z., Duanmu, D., (2017).** Use of CRISPR/Cas9 for Symbiotic Nitrogen Fixation Research in Legumes. Progress in Molecular Biology and Translational Science 149, 187-213.
- **Werner, D., (1992).** Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

- **Wikipedia**, Wilaya de Khenchela (le site consulté : 16/04/2023)  
[https://fr.wikipedia.org/wiki/Wilaya\\_de\\_Khenchela](https://fr.wikipedia.org/wiki/Wilaya_de_Khenchela).
- **Willey, M., Sherwood, L., et Woolverton, C., (2018)**. Microbiologie De Prescott. Paris : De Boek. P: 676 ; 677, 679.
- **William, G. Hopkins. (2003)**. Physiologie végétale. Paris: Boeck Supérieur. p:112
- **Zahran, H. H. (1999)**. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 968-989.
- **Zaidi, F. et Kared Y. (2017)**. Isolement et caractérisation des endosymbiotes de *Medicago polymorpha*. Mémoire fin de cycle Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. P 40.
- **Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M., Dreyfus, B. and 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.
- **Zakhia, Frédéric, Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., et De Lajudie, P. (2006)**. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*, 51(3), 375–393.
- **Zhang, F., and D. L. Smith. (1996)**. Inoculation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant Soil*. **179**, p: 233-241. Cité in (**Bendaira et Felten, 2019**).
- **Zhang, F., Charles, T. C., Pan, B. and Smith, D. L. (1996)**. Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(12), 1579-1583.



# ***ANNEXES***

## ***Annexe 01***

### ***Milieux de Culture et Solution Nutritive***

#### ***Milieu YMB (Yeast Manitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)***

<i>Mannitol</i>	<i>10,00g</i>
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>0,50g</i>
<i>NaCl</i>	<i>0,10g</i>
<i>MgSO<sub>4</sub> 7(H<sub>2</sub>O)</i>	<i>0,20g</i>
<i>Extrait de levure</i>	<i>0,50g</i>
<i>Eau distillée</i>	<i>1000 ml</i>
<i>pH</i>	<i>6,8</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

#### ***Milieu YMA (Yeast Manitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)***

<i>YMB</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Agar</i>	<i>18g</i>
<i>pH</i>	<i>6,8</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

***Milieu YMA+ Rouge Congo en g/l***

<i>YMB</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Solution stock de Rouge Congo</i>	<i>10 ml</i>
<i>Agar</i>	<i>18g</i>
<i>pH</i>	<i>6,8</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

*Après l'ajustement de pH on ajoute 10 ml de Rouge Congo puis on ajoute l'agar.*

***Milieu YMA+ CaCO<sub>3</sub> en g/l***

<i>YMB</i>	<i>1000 ml</i>
<i>CaCO<sub>3</sub></i>	<i>1g</i>
<i>Agar</i>	<i>18g</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

***Milieu GPA (Glucose Peptone Agar + Pourpre de Bromocrésol) en g/l***

<i>Glucose</i>	<i>10g</i>
<i>Peptone</i>	<i>05g</i>
<i>Solution stock de BCP</i>	<i>10 ml</i>
<i>Agar</i>	<i>18g</i>
<i>pH</i>	<i>6,8</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

*Ajouter du Pourpre de Bromocrésol, après stérilisation et refroidissement du milieu.*

**Milieu YMA+ BTB (Bleu de Bromothymol) en g/l**

<i>YMB</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Solution stock de bleu de Bromothymol</i>	<i>05 ml</i>
<i>Agar</i>	<i>15g</i>
<i>pH</i>	<i>6,8</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

*Après ajustement de pH on ajoute 05 ml de bleu de Bromothymol, puis on ajoute l'agar.*

**Milieu TY (Tryptone Yeast) en g/l**

<i>Tryptone</i>	<i>05</i>
<i>Extrait de levure</i>	<i>03</i>
<i>CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,87</i>
<i>L'eau distillée</i>	<i>1000ml</i>
<i>pH</i>	<i>6,8</i>
<i>Autoclavage</i>	<i>120 °C pendant 20 min.</i>

## **Annexe 02**

### **Réactifs et colorants**

#### **Solution Rouge Congo (YMA+RC)**

RC .....	0,25g
L'eau distillé .....	100 ml

#### **Solution Pourpre de Bromocrésol**

BCP .....	1g
Ethanol.....	100 ml

#### **Solution Bleu de Bromothymol**

BTB .....	0,5g
Ethanol.....	100 ml

#### **Solution du rouge Congo(CMC)**

Poudre de rouge Congo.....	0.1 g
Eau distillée .....	100 ml

#### **Solution d'NaCl (1M)**

NaCl.....	5.84 g
Eau distillée .....	100 ml

#### **Solution d'urée**

Urée .....	20g
Eau distillée .....	100 ml

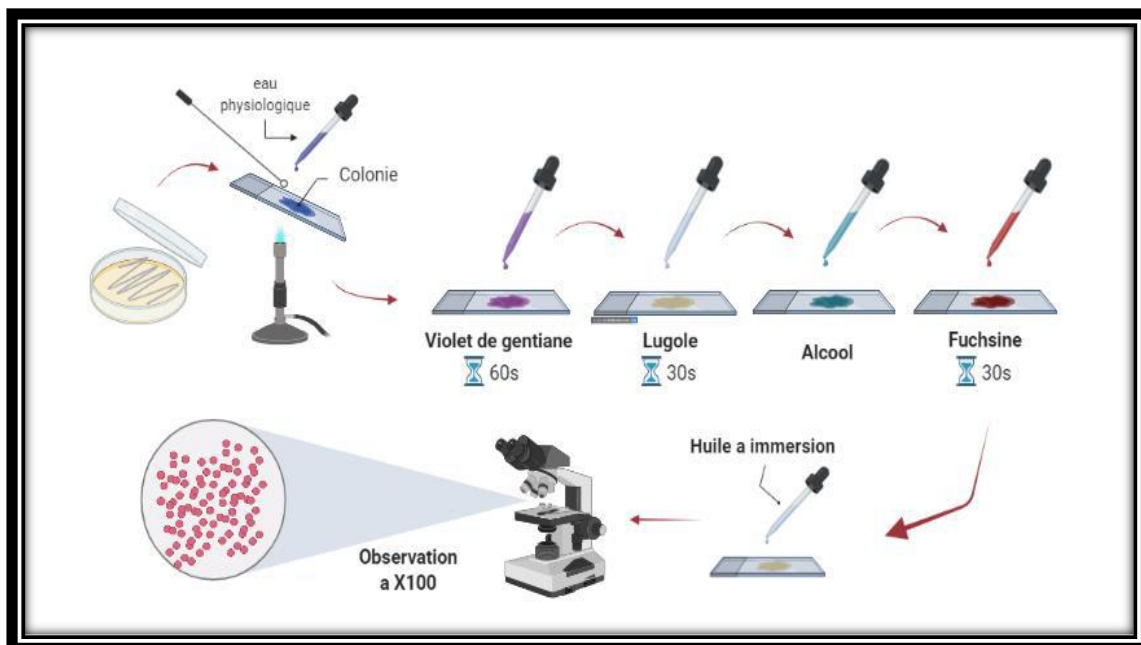
## Annexe 03

### Coloration de Gram

Avant de procéder à la coloration de Gram et sous la hotte à flux laminaire « STERIL BIO BAN model 48 », une préparation de frotti est indispensable. Cette dernière est réalisée à partir de cultures en YMA+RC sur des lames, où l'ose prélevée dispersée dans une goutte d'eau distillée stérile, puis séchée et fixée.

Le protocole expérimental consiste à :

- Recouvrir la lame avec le Violet de Gentiane et laisser agir pendant 01 minute,
  - Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes,
  - Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte le mélange « Alcool-Acétone »,
  - Laver à l'eau distillée
  - Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir pendant 01 minute,
  - Laver à l'eau distillée,
  - Sécher avec un papier absorbant,
- Observer au microscope (x 100) en rajoutant l'huile à immersion.



**Figure :** coloration de gram

## ***Annexe 04***

### ***Galerie api 20NE***

#### ➤ **Inoculation De La Galerie**

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédent en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation des bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSI pette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

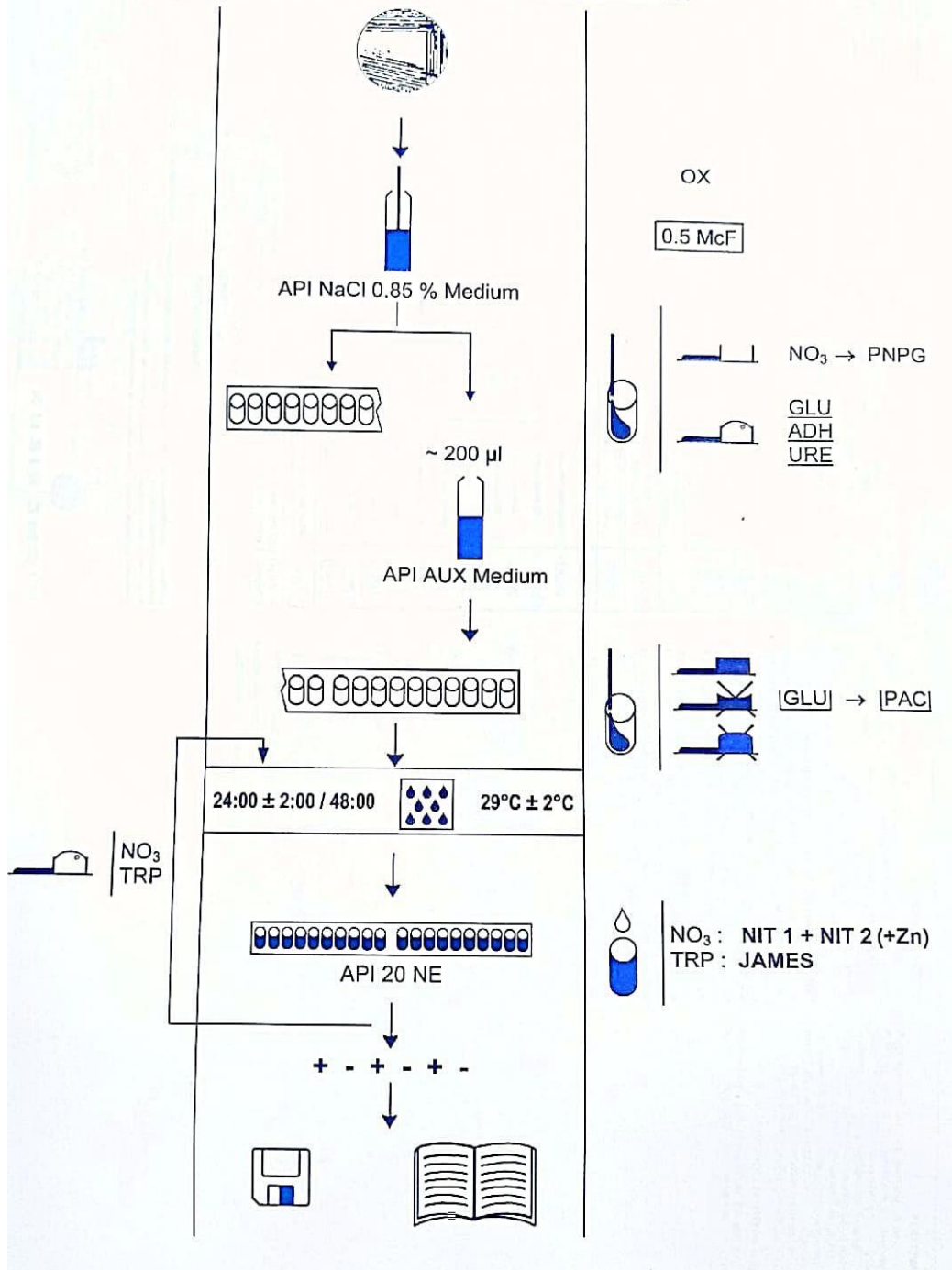
- ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200µl de la suspension précédente Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles

- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais convexe. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.

- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests souligné (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.

- Renferme la boîte d'incubation et incubé à 29°C ±2 °C pendant 24 heures (±2 heures).

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO /  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODE / METODYKA





## ➤ Tableau de lecture

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolora      rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min rose      incolora	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat incolora vert pâle / jaune      rose	
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D- Galactopyranosidase)	incolora	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIplique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**  
**Filière : Ecologie et Environnement**  
**Spécialité : *Ecologie Microbienne***

**Caractérisation des endosymbiotes chez la légumineuse**  
***Trigonella gladiata* Stev.**

**Résumé**

Quinze souches bactériennes isolées à partir de nodules racinaires de la légumineuse sauvage *Trigonella gladiata* Stev., collectée dans la wilaya de Khenchela ont été étudiées d'un point de vue phénotypique pour trouver les caractères cellulaires, culturels, physiologiques, et biochimiques. Phénotypiquement, les isolats étudiés sont des coccobacilles à Gram négatif de croissance rapide, ont présenté une bonne croissance à 28°C et Elles acidifient les milieux BTB et GPA. Les résultats obtenus par caractérisation biochimique sur galeries API 20NE révèle une différence dans le pouvoir d'assimilation des différents substrats ce qui renseigne sur l'existence d'une diversité de l'équipement enzymatique entre les différentes souches isolées.

Ces résultats indiquent donc que les isolats portent des caractères phénotypiques similaires aux (BNL) à croissance rapide. Bien que cette caractérisation reste insuffisante.

**Mots clés :** Nodule ; Légumineuse ; *Trigonella gladiata* Stev. ; BNL ; Galeries API 20NE.

**Membre du jury :**

**Président du jury :** *M. BENHIZIA Yacine* (Professeur - UFM Constantine 1).  
**Rapporteur :** *M. CHABBI Rabah* (MAA - UFM Constantine).  
**Examinatrice :** *M<sup>me</sup>. BOUKAOUS Leila* (MRB - CRSP).

**Présentée par :** AOUANE Boutheina  
AOUANE Aya

**Année universitaire : 2022 -2023**



