

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 : Microbiologie
Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

Intitulé :

**Identification phénotypique de quelques bactéries endophytes isolées
du pois**

Présenté par : REMOUCHE Esma
SAIH Safa
MOSBAH Zebida

Le 22/06/2023

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme. OULMI L. (Maître de conférences - UFM, Constantine 1).

Rapporteuse : Mme. GACI M. (Maître de Conférences- UFM Constantine 1).

Examinatrice : Mme. BOUCHLOUKH W. (Maître de Conférences- UFM Constantine 1).

**Année universitaire
2022 - 2023**

Remerciements

Après avoir rendu grâce et un grand merci à DIEU, le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force pour réussir ce travail.

*Nous tenons à exprimer toutes nos reconnaissances à notre encadrante Mme. **GACI Meriem**. Nous la remercions de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées et d'être patiente, disponible et sérieuse avec nous durant toute la période de la préparation de notre mémoire de fin d'études, merci de nous avoir donné une précieuse opportunité de mener un travail scientifique collectif.*

*Nous adressons un grand remerciement pour les membres du jury, Mme **OULMI L.** et Mme **BOUCHLOUKH w.** qui ont accepté d'évaluer ce travail et nos sincères remerciements à tous les enseignants ainsi qu'à toute l'équipe pédagogique du département de microbiologie de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 Ainsi qu'à toutes personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à nos questions durant nos recherches.*

*Enfin, nous remercions aussi profondément Mme. **ZEROUKI Leila** ingénieur de laboratoire de Microbiologie pour son soutien avec tout l'équipement de laboratoire nécessaire et pour sa gentillesse.*

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie le fruit de mes 17 ans d'études à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail,

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père MOHAMED KAMEL et à la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère SAMIA. Chaque ligne de cet mémoire chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents,

A mes chères sœurs AMEL & MARWA et mes chers frères TAKI & HICHEM qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur,

A la plus belle fillette du monde SADANE, Aux petits hommes de la famille OUWAIS, IYED & TEYM, que Dieu les garde,

A ma grande mère FATMA, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie. A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant,

A mon adorable chat BICHOU qui sait toujours comment procurera joie et le bonheur à mon cœur,

A toute personne qui porte le nom SAIH et tous mes collègues de la promotion BMM,

Sans oublier mes binômes en souvenir de nos éclats de rire et des bons moments, en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble, j'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

SAIH SAFA

Dédicaces

A l'aide d'ALLAH tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser

Ce travail que je dédie :

A Ma Très Chère Mère : YASSMINA

Merci pour ton sourire qui est la lanterne qui éclaire mon chemin, pour tous les moments de bonheur que tu m'apportes quel que soit le terme et quel que soit l'expression, rien ne pourra exprimer mon amour telle que mon cœur le ressent, que dieu te garde et te protège

A Mon Très Cher Père : Fouzi

Je vois en toi le courage l'amour et toutes les qualités requises chez un père ... Tu es mon soutien dans les moments difficiles, et la source intarissable de mon inspiration J'espère que tu trouveras dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Que dieu vous garde et protège.

A ma sœur « Amina »

A mes Grandes Parents

A toute ma famille sans exception.

A mes Amies proches

Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser de près ou de Loin

Remouche Esma

Dédicaces

*Avec un énorme plaisir, je dédie ce modeste travail à mes très chers parents **Hamid** et **Djamila**, source de tendresse, de noblesse et d'amour, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donnée un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A ma chère sœur **Wissem** pour son soutien moral*

*Mon très cher frère **Imad** et je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur. Je dédie particulièrement à tous mes oncles et tantes, cousines et cousins et toute la famille **Mosbah**.*

Sans oublier mes binômes et aussi à tous mes amis que je n'ai pas cités, et à tous ceux qui me connaissent.

A tous ceux que j'aime.

ZOUBIDA

Résumé

Le pois (*Pisum sativum* L.) est l'un des genres les plus connus parmi les légumineuses, appartenant à la famille des Fabacées qui forme une association symbiotique avec les bactéries du sol connues sous le nom de « rhizobium », mais dans certains cas les bactéries endohytes non rhizobiennes peuvent se rencontrer au sein des nodules racinaires de cette plante. Le but de cette étude est d'identifier ces bactéries. La démarche a été réalisée selon les caractères morphologiques et biochimiques en se basant sur une étude macroscopique et microscopique, les tests de catalase, oxydase, la nitrate réductase, la voie d'attaque du glucose, le type respiratoire, la mobilité microbienne et l'activité pectinolytique. Les résultats ont montré une diversité parmi les isolats. L'étude macroscopique et microscopique des souches a montré une variété des caractères cultureux dans lequel les souches se présentent sous forme des bacilles à Gram négatif. Toutes les données nous conduisent à déduire que les souches sont des bacilles à Gram négatif non *Enterobacteriaceae*.

Les mots clés : *Pisum sativum* L., Endophytes, Identification, Non *Enterobacteriaceae*.

Abstract

The pea (*Pisum sativum* L.) is one of the best known genera of legumes, belonging to the Fabaceae family, which forms a symbiotic association with soil bacteria known as "rhizobium", but in some cases non-rhizobial endohytic bacteria may be present. endohytic bacteria can be found in the root nodules of this plant. The aim of this study is to identify these bacteria. The approach was based on morphological and biochemical morphological and biochemical characteristics, based on macroscopic and microscopic studies and tests for catalase, oxidase, nitrate reduction, glucose attack pathway, respiratory type, microbial mobility and pectinolytic activity. The results showed diversity among the isolates. Macroscopic and microscopic study of the strains showed a variety of cultural variety of cultural characteristics in which the strains appeared in the form of Gram-negative bacilli. Gram-negative bacilli. All the data leads us to deduce that the strains are bacilli no *Enterobacteriaceae*.

Key words: *Pisum sativum* L., Endophytes, Identification, Non *Enterobacteriaceae*

الملخص

لبازلاء (*Pisum sativum* L.) هي واحدة من أكثر الأجناس شهرة بين البقوليات ، تنتمي إلى عائلة Fabacées التي تشكل ارتباطاً تكافلياً مع بكتيريا التربة المعروفة باسم " rhizobium " ، ولكن في بعض الحالات يمكن العثور على بكتيريا endohytes non rhizobiennes داخل العقيدات الجذرية لهذا النبات. الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذه البكتيريا. تم تنفيذ النهج وفقاً للخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية بناءً على دراسة مجهرية وميكروسكوبية ، واختبارات الكاتلاز ، والأوكسيديز ، واختزال النترات ، وطريقة هجوم الجلوكوز ، ونوع الجهاز التنفسي ، والحركة الميكروبية ، ونشاط التحلل. أظهرت النتائج تنوعاً بين العزلات. أظهرت الدراسة العيانية والميكروسكوبية للسلاسل مجموعة متنوعة من السمات الثقافية التي تكون فيها السلاسل في شكل عصيات سالبة الجرام. تقودنا جميع البيانات إلى استنتاج أن السلاسل هي عصيات غير معوية سالبة الجرام.

الكلمات المفتاحية: *Pisum sativum* L. ، endophytes ، تحديد الهوية ، *non Enterobacteriaceae*.

Liste des abréviations

ABA : *Acide A***B***scissique.*

LPS: *Lipo***P***oly***S***accharides.*

LPWG: *Legume Phylogeny Working Group.*

PCR: *Polymerase Chain Reaction.*

PTY: *Pea Top Yellow.*

MALDI-TOF MS: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry.*

NifH: *Nitrogen-fixing.*

Liste des figures

Figure 1. Les différentes parties du pois	04
Figure 2. La graisse bactérienne du pois causée par le pathovar <i>Pseudomonas syringae</i>	06
Figure 3. Les nécroses racinaires causées par <i>Aphanomyce</i>	06
Figure 4. La jaunisse apicale du pois causée par le virus <i>Pea Top Yellow</i> (PTY) ...	06
Figure 5. Colonisation des bactéries endophytes	10
Figure 6. Aspect des colonies de la souche (23) sur le milieu LMG 201 après 72 H d'incubation.....	20
Figure 7. Observation microscopique des bactéries après coloration de Gram	21
Figure 8. Résultats du test de la catalase	21
Figure 9. Résultat positif du test d'oxydase	22
Figure 10. Résultats positifs du test de la nitrate réductase.....	23
Figure 11. Résultats du test de la voie d'attaque du glucose.....	23
Figure 12. Résultats du milieu Mannitol-mobilité	24
Figure 13. Activité pectinolytique chez les isolats 14 et 53	25

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales sous familles des légumineuses	03
Tableau 2. La valeur nutritive du pois	05
Tableau 3. Phytohormones communément impliquées dans la régulation physiologique de la plante	12
Tableau 4. Les tests d'identification	13

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction 1

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1.	Les légumineuses	3
1.1	Définition.....	3
1.2.	Taxonomie des légumineuses	3
1.3.	Le pois.....	3
1.3.1.	Classification de l'espèce <i>Pisum sativum</i>	5
1.3.2.	L'intérêt nutritif	5
1.3.3.	Les ennemies du pois	6
2	Les endophytes.....	7
2.1	Définition.....	7
2.2	Bactéries endophytes	7
2.3	Principaux genres des endophytes	8
2.3.1	Le genre <i>Pseudomonas</i>	8
2.3.2	Le genre <i>Bacillus</i>	8
2.4	Localisation	8
2.5	Transmission et colonisation des endophytes.....	8
2.6	Rôle dans les systèmes végétaux	10
2.6.1	Stimulation de la croissance de la plante-hôte	10
2.6.2	Protection de la plante contre les stress.....	11
3	Identification des bactéries endophytes	11

3.1	Tests phénotypiques	11
3.2	Tests moléculaires	14
3.2.1	Séquençage.....	14
3.2.2	MALDI-TOF MS	14

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I.	Étude Macroscopique des cultures.....	15
II.	Étude Microscopique	15
III.	Tests biochimiques	16
1.	Recherche de la catalase.....	16
2.	Recherche de l'oxydase.....	16
3.	Réduction des nitrates	16
4.	Mise en évidence de la voie d'attaque du glucose.....	17
5.	Mise en évidence de la mobilité bactérienne	17
6.	Le type respiratoire	18
7.	Activité pectinolytique	18

Chapitre 03 : Résultats et discussion

I.	Etude macroscopique	20
II.	Etude microscopique.....	20
III.	Tests biochimiques	21
1.	Recherche de la catalase	21
2.	Recherche de l'oxydase	22
3.	La réduction des nitrates	22
4.	La mise en évidence de la voie d'attaque du glucose	23
5.	Type respiratoire	24
6.	Mise en évidence de la mobilité bactérienne	24
7.	Activité pectinolytique.....	24
	Conclusion & perspectives.....	26
	Références bibliographiques.....	28
	Annexe	I

Introduction

Les légumineuses constituent une source importante de glucides, minéraux, vitamines et principalement les protéines végétales qui peuvent corriger le déficit en protéines animales (Ben mbarek *et al.*, 2012; Ouazib, 2017). Le pois (*Pisum sativum* L.) est la cinquième légumineuse la plus cultivée dans le monde, est considérée comme une source importante des protéines surtout en Afrique (Mekhaldi, 2020). Les légumineuses ont un avantage significatif par rapport aux autres plantes en ce sens qu'elles peuvent s'associer à des bactéries du sol. Une telle association microbienne bénéfique implique des bactéries communément appelées rhizobiums. La symbiose entre les légumineuses et les rhizobiums est connue pour fixer l'azote atmosphérique à travers des structures uniques appelées nodules.

Le nodule est une structure typique dans laquelle résident divers types de bactéries (Dekak *et al.*, 2020), dont la plupart sont colonisées par des espèces de rhizobiums, bien que d'autres bactéries présentes dans le nodule soient collectivement appelées des endophytes non rhizobiens (ENR) (Preyanga *et al.*, 2021). Ces derniers pénètrent dans la plante par les tissus et restent à l'intérieur de la plante (Hardoim *et al.*, 2008). Plusieurs études suggèrent que les ENR peuvent améliorer la croissance des plantes, augmenter la productivité et protéger contre les agents pathogènes (Maheshwari *et al.*, 2020).

Selon Mengistu (2020), un déséquilibre dans les interactions hôte-microbe peut conduire à un changement de mode de vie des bactéries endophytes, passant d'endophytes à pathogènes. Les stratégies que les plantes utilisent pour distinguer les bactéries endophytes des pathogènes font toujours l'objet de recherches actives. Cependant, en raison des énormes avantages qu'offrent les endophytes, ce domaine fait l'objet de recherches intensives dans le monde entier. Une compréhension plus claire des bactéries endophytes est nécessaire pour exploiter leur plein potentiel. Cela représente un défi car les méthodes disponibles pour la détection, l'isolement et l'identification sont insuffisantes pour fournir une image complète de l'interaction plante-bactéries (Santoyo *et al.*, 2016).

Notre projet de fin d'étude s'inscrit dans le cadre d'identifier et caractériser phénotypiquement, à travers des examens macroscopique et microscopique soutenues et complétés par des tests biochimiques, quelques bactéries endophytes non rhizobiennes isolées à partir des nodules racinaires du pois. Ainsi, notre recherche sera répartir en trois chapitres :

- Le premier chapitre traite les concepts relatifs aux légumineuses et explique leurs relations avec les bactéries endophytes.

- Le second chapitre est consacré pour les différentes techniques réalisées pour l'identification des souches en questions.
- Le troisième chapitre montre les différents résultats obtenus avec leurs interprétations.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1. Généralités sur les légumineuses

1.1 Définition

Les légumineuses sont composées des légumes secs (haricots, pois, lentilles, pois chiches...), soja, cacahuètes. Elles sont riches en protéines, minéraux (phosphore, fer), vitamines et fibres. Elles sont considérées comme une bonne source de vitamines (riboflavine, niacine et thiamine). Donc leur composition est proche aux aliments du groupe "viande, poisson, œufs". Les légumineuses fournissent environ 25 % de protéines. Cependant, l'acide aminé méthionine fournit une valeur nutritionnelle nettement inférieure de celle du poisson, œufs ou viande. Les légumineuses sont riches en glucides complexes. Elles sont donc une excellente source d'énergie. Elles contiennent très peu et presque pas d'acides gras. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en fibres. Parmi les légumineuses, le pois (*Pisum sativum*), également appelé petit pois, est l'une des légumineuses alimentaires les plus importantes du cycle court, comme les haricots verts et les fèves (Lévesque et Trudeau, 1994).

1.2. Taxonomie des légumineuses

Une nouvelle classification a été proposée par *The Legume Phylogeny Working Group (LPWG)* en 2017 qui divise les légumineuses en six sous-familles : *Caesalpinioideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae* et *Papilionoideae* (tableau 1).

Tableau 1. Les principales sous familles des légumineuses (LPWG, 2017).

<i>Caesalpinioideae</i>	<i>Cercidoideae</i>	<i>Detarioideae</i>	<i>Dialioideae</i>	<i>Duparquetioideae</i>	<i>Papilionoideae</i>
-148 genres. - 4400 espèces. - Possèdent des nodules.	- 12 genres. - 33espèces. - Dépourvues de nodules.	- 84 genres. - 760espèces - Dépourvues de nodules.	- 17 genres. -85espèces. -Dépourvues de nodules.	- une seule espèce. - Dépourvues de nodules.	- 503 genres. - 14000 espèces. - Possèdent des nodules déterminés et indéterminés.

1.3. Le pois

La première culture du pois semble avoir été en Asie occidentale, d'où il s'est répandu en Europe, en Chine et en Inde. Les feuilles du pois sont composées de 4 à 6 folioles à disposition alterne. Elles ont différentes teintes du vert jaune au vert bleu foncé. Les folioles sont entières ou plus ou moins dentées, de forme ovale ou elliptique, leur extrémité est arrondie

et crénelée, pointue ou tronquée selon les génotypes. La feuille se prolonge par des vrilles terminales de plusieurs centimètres de long. Le fruit du pois est de type gousse de 4 à 11 cm de longueur, dont elle contient 5 à 10 graines. Les graines sont rondes, lisses et de couleur verte (Figure 1) (Zohary et Hopf, 2000).

L'espèce de *Pisum sativum* fournit plusieurs types de nourriture pour l'humain et l'animal :

-Les pois secs, graines récoltées à maturité, sont des légumes secs et également donné au bétail (volailles, oiseaux) ou sous formes de farine (chèvre, mouton, vache). Ces graines sont également considérées comme une matière première pour l'industrie de transformation (protéiques extraits, amidon).

-Les pois frais sous forme de graines immatures ou de gousses entières non mures, considérés comme un légume frais appelé petit pois.

-Les plantes entières sont un fourrage sec ou vert pour les ruminants (Guersses et Harrat, 2018).

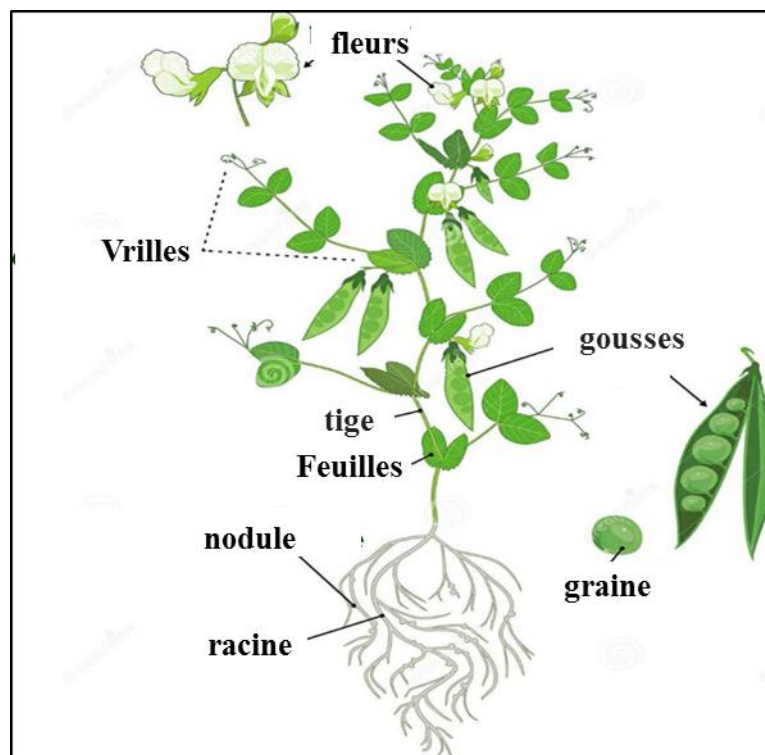


Figure 1. Les différentes parties du pois (Web 1)

1.3.1. Classification de l'espèce *Pisum sativum*

L'espèce *Pisum sativum* appartient au règne des *plante*, la classe des *Equisetopsida*, la sous-classe des *Magnoliidae*, l'ordre des *Fabales*, la famille des *Fabaceae*, la sous-famille des *Papilionoideae* et le genre *Pisum*.

1.3.2. L'intérêt nutritif

Les pois ont de multiples utilisations finales, y compris les feuilles, les gousses vertes, les graines vertes immatures et les graines mûres séchées qui peuvent être utilisées comme alimentation humaine ou animale. Principalement consommé à l'état frais (85 % d'eau) ou à l'état sec (15% d'eau). Les graines de pois sont riches en vitamines, en minéraux, en protéines, en sucres solubles et en fibres (Tableau 2). Le pois, comme d'autres légumineuses, accumule également des substances naturelles bénéfiques pour la santé humaine. Les effets observés sur les maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète et autres, peuvent être le résultat de la combinaison synergique de ses composés bioactifs, tels que des phytostérols, des isoflavones, des saponines et des alcaloïdes (Dixon et Sumner, 2003).

Tableau 2. La valeur nutritive du pois (çakir *et al.*, 2019).

Élément	Quantité	Unité
Energie	118	kcal
Macromolécules		
Protéines	8.34	g
Lipides	0.039	g
Glucides	21.10	g
Fibres alimentaires	8.3	g
Minéraux		
Calcium	14	mg
Fer	1.29	mg
Magnésium	36	mg
Phosphore	99	mg
Potassium	362	mg
Vitamines		
Vitamines C	0.4	mg
Vitamines B6	0.048	mg
Vitamines E	0.03	mg

1.3.3. Les ennemies du pois

Le pois peut être exposé à des différentes maladies comme :

- Les maladies bactériennes : la graisse bactérienne du pois causée par les pathovar de *Pseudomonas syringae* (Figure 2) (Grondeau, 1992).
- Les maladies cryptogamiques : Les nécroses racinaires sont causées par plusieurs types de champignons des genres *Aphanomyce* (Figure 3) (Papavizas et Ayers, 1974).
- Diverses maladies virales dont la jaunisse apicale du pois due au virus *Pea Top Yellow* (PTY) (Figure 4) (Fraval, 1969).



Figure 2. La graisse bactérienne du pois causée par le pathovar *Pseudomonas syringae*

(Web 2)



Figure 3. Les nécroses racinaires causées par *Aphanomyce* (Web 3)



Figure 4. La jaunisse apicale du pois causée par le virus *Pea Top Yellow* (PTY) (Web 4)

2 Les endophytes

2.1 Définition

Le terme "endophyte" vient du grec "endon" qui signifie intérieur et "phyton" qui signifie plante. Les endophytes vivent à l'intérieur des cellules végétales et ne causent aucun dommage évident à son hôte. Il est bien connu que les endophytes jouent un rôle central, au travers les symbioses, sur le développement de la plante. La majorité des endophytes isolés sont définis comme des commensalistes sans rôle clairement précis au sein des plantes. Les endophytes peuvent se comporter comme des phytopathogènes lorsque les interactions mutualistes initiales avec leurs hôtes se transforment en interactions délétères notamment sous la pression du stress abiotique. Les bactéries et champignons endophytes habitent les plantes de manière inter/intracellulaire et interagissent avec leurs hôtes de manière biochimique et génétique. Cette définition aborde les principales fonctions de ces microorganismes, en particulier favoriser la croissance et la défense par la synthèse de phytohormones, d'enzymes ou de précurseurs de métabolites secondaires végétaux, et fournir un nouveau répertoire caché de produits naturels bioactifs ; pesticide pharmaceutique et autres applications biotechnologiques (Nawed et Ramesh, 2015).

2.2 Bactéries endophytes

Les bactéries associées aux plantes et isolées des surfaces des racines (rhizoplane) et des feuilles (phylloplane) sont appelées épiphytes (Andrew et Harris, 2000), tandis que celles isolées des tissus qui y vivent sans nuire à l'hôte sont appelées endophytes (Azevedo *et al.*, 2000). Généralement les bactéries endophytes proviennent de la rhizosphère, phyllosphère, des communautés bactériennes épiphytes, aussi bien que des graines ou de matériel de propagation infesté (Hallmann *et al.*, 1997). La densité des populations des endophytes est très variable et dépend du génotype de l'hôte, des espèces bactériennes et des conditions environnementales (Dudeja *et al.*, 2012). Elles peuvent bénéficier directement aux plantes hôtes en améliorant l'absorption des nutriments par les plantes et en modulant les phytohormones liées à la croissance et aux stress. Indirectement, les bactéries endophytes peuvent améliorer la santé des plantes en ciblant les ravageurs et les agents pathogènes avec des antibiotiques, des enzymes hydrolytiques, une limitation des nutriments et en induisant les défenses des plantes. Certaines bactéries endophytes peuvent avoir une large gamme d'hôtes et peuvent être utilisées comme bio-inoculants pour développer un système agricole durable (Imran *et al.*, 2019).

2.3 Principaux genres des endophytes

Les bactéries endophytes peuvent coloniser simultanément une grande variété de plantes. Parmi les plus importants genres des endophytes sont :

2.3.1 Le genre *Pseudomonas*

Ce genre de bactéries est omniprésent et appartient au groupe des eubactéries non photosynthétique et chimiotrophes, non sporulé, mobile par un ou plusieurs flagelles. Ce genre joue un rôle crucial dans l'amélioration de la croissance de la plante (Palleroni, 2008).

2.3.2 Le genre *Bacillus*

Ce sont des bactéries à Gram positif, qui sont capables de résister à des conditions environnementales défavorables grâce à la production des endospores (Probanza *et al.*, 2002). Quelques espèces de ce genre peuvent produire une large gamme de molécules actives capables d'inhiber la croissance des agents phytopathogènes (Bouznad, 2016).

2.4 Localisation

Les endophytes sont des micro-organismes omniprésents trouvés sous différents types de climats dans différentes régions du monde, y compris les régions tempérées et tropicales, les déserts, les prairies, les terres cultivées et les savanes (Arnold, 2007).

Les régions tropicales semblent être des régions géographiques avec de très fortes densités de colonisation endophytique chez les plantes. Plusieurs facteurs influencent la distribution des endophytes dans les plantes. La localisation géographique est l'un des acteurs les plus influençant (Arnold et Lutzoni, 2007).

2.5 Transmission et colonisation des endophytes

Bien que la voie de transmission de nombreux endophytes n'ait pas encore été identifiée, des études ont montré des exemples de transmission horizontale (transmission par des agents environnementaux) ou verticale (transmission d'une plante « parent » à une plante « fille »). Les graines de plantes hôtes constituent l'une des voies de transmission endophytiques. En effet, des endophytes se développent à l'intérieur de l'embryon de la graine, entraînant la colonisation des jeunes plantes en germination (Shahzad *et al.*, 2018). La colonisation des graines qui permet cette transmission peut se produire de trois voies :

- via les tissus non-vascularisés ou le xylème des plantes,
- via les organes reproducteurs femelles comme le stigmate,
- ou par la contamination exogène des graines à partir de l'environnement.

La sécrétion d'exsudat (contient des acides organiques, des acides aminés ou des protéines) dans la rhizosphère des plantes peut attirer des micro-organismes par le biais de ces racines. La première étape de colonisation des endophytes est la fixation à la surface cellulaire de la plante. Afin de détecter des motifs moléculaires associés aux microbes tels que : les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes, la chitine... les cellules végétales disposent de récepteurs de reconnaissance à leur surface (Kandel *et al.*, 2017).

Après fixation, l'étape suivante est l'insertion dans le tissu végétal. L'entrée endophytique dans les plantes se produit très probablement au niveau des discontinuités, telles que les sites d'émergence et les fissures des tiges des racines. Il présente également la capacité de modifier les parois cellulaires des plantes en sécrétant des endoglucanases, des pectinases... favorisant leur entrée (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006).

Afin de coloniser la plante, les espaces intercellulaires riches en acides aminés et les sucres sont les zones d'établissement des endophytes. Ces endophytes peuvent coloniser un organe ou la plante entière. Leur déplacement au sein de la plante se fait grâce à un système vasculaire ce qui permet la colonisation des organes reproducteurs et le déroulement d'une transmission verticale (Hardoim *et al.*, 2015).

Indépendamment de la transmission verticale, les plantes peuvent être colonisées à tout moment par des endophytes dans divers organes tels que les racines, les tiges, les feuilles et même les fleurs. Cette transmission horizontale peut se dérouler au sein du sol, l'atmosphère par dispersion de spores ou via des vecteurs tels que les insectes. Pour les bactéries endophytes, le sol est le site privilégié de transmission horizontale (Figure 5) (Frank *et al.*, 2017).

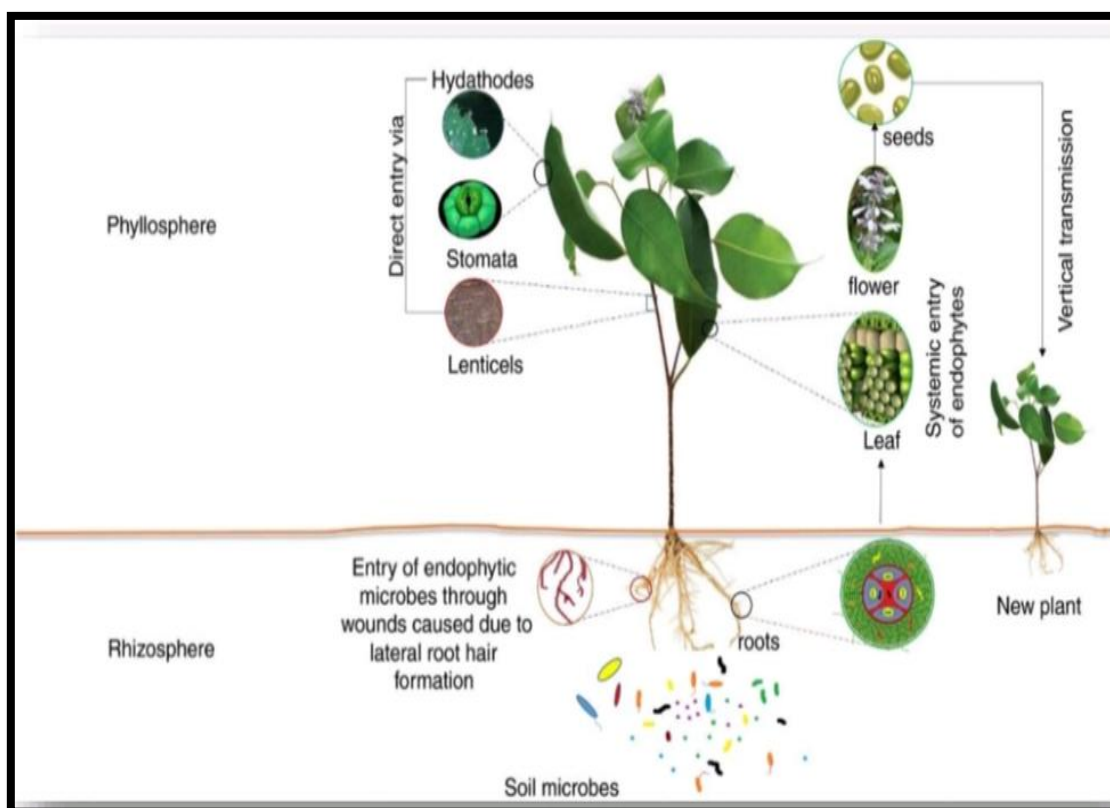


Figure 5. Colonisation des bactéries endophytes (Web 5)

2.6 Rôle des endophytes dans les systèmes végétaux

Il est à noter que les rôles endophytiques décrits ne sont pas communs à toutes les souches et que les mêmes souches n'ont pas les mêmes fonctions selon la plante et les conditions dans lesquelles elles sont colonisées. Les deux fonctions les plus fréquemment rapportées des endophytes du facteur environnemental sont : de stimuler la croissance et le développement de la plante hôte et de la protéger contre les différents stress environnementaux (Hardoim *et al.*, 2015).

2.6.1 Stimulation de la croissance de la plante-hôte

L'apport en nutriments tel que l'azote, le phosphore... influe sur le développement des plantes, comme en témoignent les nombreux apports d'engrais en culture maraîchère. Certains endophytes se sont révélés capables de faciliter cet approvisionnement dans les plantes (Barthélemy, 2019). La fixation microbienne de l'azote est un mécanisme bien étudié au sein de la rhizosphère. Cette fixation permet à la plante de contribuer et de participer à son développement (Hardoim *et al.*, 2015). De nombreux endophytes bactériens, dont *Azotobacter*, *Rhizobium* et *Clostridium*, ont montré leur capacité à fixer l'azote. Toutes ces bactéries possèdent un gène *nifH* conservé qui code pour une protéine nitrogénase qui permet la réduction

enzymatique de N₂ en ammoniac NH₃. L'ammoniac peut ensuite être oxydé en nitrates selon le processus de nitrification biologique par le pouvoir des bactéries. Cette minéralisation rend l'azote assimilable par les plantes. La bactérie endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*, qui est symbiotique avec diverses espèces végétales, présente également des taux de fixation d'azote élevés (Yang *et al.*, 2015). Les phytohormones (hormones végétales) sont des régulateurs de croissance des plantes. Ces substances chimiques contrôlent la croissance des plantes, peuvent être impliquées dans la communication interindividuelle, et leur reconnaissance par les plantes affecte leur fonctionnement. Plusieurs classes d'hormones végétales ont été identifiées. Certaines des mieux étudiées comprennent les gibbérellines, les auxines, les cytokinines et des molécules telles que l'éthylène, l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (Tableau 3) (Egamberdieva *et al.*, 2017).

2.6.2 Protection de la plante contre les stress

Les endophytes produisent divers métabolites secondaires tels que : alcaloïdes, peptides, stéroïdes, flavonoïdes. Ces derniers assurent aux endophytes des capacités défensives, protègent non seulement contre les attaques, mais également les plantes hôtes du stress biotique et abiotique (Zhang *et al.*, 2006). En raison de l'immobilité des plantes, elles sont particulièrement vulnérables aux prédateurs. Pour assurer leur survie, ils peuvent utiliser entre autres des défenses chimiques : certains endophytes participent à cette défense chimique (stress biotique) contre les micro-organismes phytopathogènes ou des prédateurs herbivores (Barthélemy, 2019). La sécheresse, les inondations, la salinité et la présence de métaux lourds sont les principaux stress abiotiques auxquels sont confrontées les plantes. Ces stress affectent leur développement et leur physiologie en altérant la régulation génétique des voies de signalisation cellulaire, entraînant un retard de croissance voire une nécrose (Ma *et al.*, 2016)

3 Identification des bactéries endophytes

3.1 Tests phénotypiques

L'évaluation phénotypique consiste à étudier le profil biochimique et les caractéristiques métaboliques des micro-organismes en examinant leurs conditions de croissance, leur activité enzymatique et leur composition cellulaire. Le choix de la méthode utilisée pour l'identification microbienne dépend de l'espèce et de la nature de l'organisme (Tableau 4) (Puigmal, 2016).

Tableau 3. Phytohormones communément impliquées dans la régulation physiologique de la plante (Egamberdieva *et al.*, 2017).

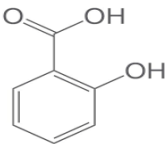
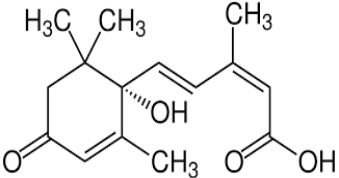
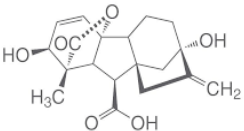
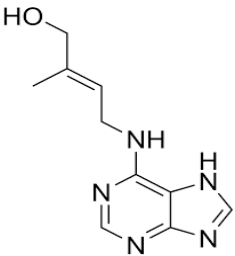
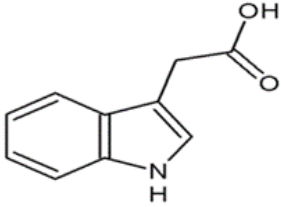
	Auxine
	l'acide abscissique
	l'acide gibbérellique
	Cytokinine
	L'acide salicylique

Tableau 4. Les tests d'identification (Joffin et Leyral, 2006).

Test	But
Coloration de Gram	La méthode de coloration de Gram permet la mise en évidence du type de la paroi bactérienne.
Recherche d'oxydase	C'est un test qui permet la mise en évidence de la présence de l'enzyme Cytochrome C oxydase.
Recherche de la catalase	Ce test indique si la bactérie possède l'enzyme catalase qui permet de réduire le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).
Le type respiratoire	Le type respiratoire définit comment une espèce bactérienne interagit avec le dioxygène (O ₂).
La réduction de nitrate	C'est un test qui permet de détecter si la bactérie a la capacité de réduire le nitrate (NO ₃ ⁻).
Mise en évidence de la voie d'attaque du glucose	Cette méthode permet de déterminer le métabolisme oxydatif ou fermentatif des bactéries.
Mobilité bactérienne	La mobilité généralement révélée dans un milieu mannitol mobilité.
Résistance aux antibiotiques	Ce test permet de déterminer si la bactérie est capable de résister aux antibiotiques.
Les galeries API	Un ensemble de tubules prêts à l'emploi qui permet l'identification microbienne en effectuant rapidement des tests biochimiques miniaturisés.
Recherche de pectines	Ce test permet de détecter si les bactéries sont capables de dégrader les molécules polysaccharidiques de la pectine.

3.2 Tests moléculaires

3.2.1 Séquençage

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, cette technique est suivie de la comparaison du résultat obtenu avec celui d'une séquence de référence connue. Le séquençage de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la biologie tels que : l'étude génétique, l'information biologique contenue par les séquences nucléiques... (Lamoril *et al.*, 2008).

3.2.2 MALDI-TOF MS

La technologie MALDI-TOF MS en microbiologie peut identifier les microorganismes jusqu'au niveau de l'espèce. Le principe se base sur l'ionisation des protéines bactériennes par un rayon laser et la création de pics caractéristiques (spectre). A partir d'une base de données de spectres, le logiciel associé recherche la correspondance à l'espèce de la bactérie selon un indice de fiabilité entre les deux spectres. Un protocole simple, la rapidité des résultats et le faible coût des analyses sont les principaux avantages de cette technique (Rakotonirina, 2021).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de Microbiologie (n° 09) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1. Elle s'est étalée sur une période de deux mois depuis le 9 Avril jusqu'à le 18 Mai 2023. Les quatorze souches bactériennes de cette étude font partie de la collection de notre encadrante Dr. GACI M. Ce sont des bactéries endophytes non rhizobiennes isolées à partir des nodules de la plante *Pisum sativum*. L'objectif de notre travail est de les identifier phénotypiquement en employant les différentes méthodes de Microbiologie de routine.

I. Étude Macroscopique des cultures

Permet de bien préciser les caractères culturels des colonies tels que (forme, taille, aspect des colonies, la surface, opacité...) qui peuvent nous orienter pour l'identification bactérienne (Reynolds, 2021).

Pour ce test le milieu de culture LMG201 (Annexe 1) a été utilisé. Les boîtes sont ensemencées et incubées à 28 °C pendant 3 jours.

II. Étude Microscopique

L'étude microscopique a été réalisée en se basant sur la coloration de Gram. Cette dernière doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mis au point le protocole en 1884. Le principe repose sur les différences de composition chimique et d'ultrastructure des parois cellulaires conduisant à la distinction des bactéries à Gram positif et Gram négatif.

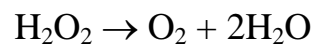
La coloration de Gram est basée sur l'action successive de plusieurs substances ; une goutte d'eau distillée stérile a été déposée à l'aide d'une micropipette sur une lame propre dans laquelle une colonie a été dilacérée soigneusement. Après séchage, le frottis a été fixé au-dessus de la flamme du bec bunsen. Après fixation, une coloration au violet de Gentiane (Cristal violet) a été faite dans laquelle la lame a été plongée pendant 1 minute dans ce colorant. Après rinçage à l'eau distillée, le Lugol a été étalé sur la lame et laissé agir pendant 1 minute. Une décoloration rapide à l'alcool-acétone a été réalisée, le mélange alcool-acétone a été versé goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement jusqu'à la décoloration qui doit être rapide (environ 10 secondes), la lame a été rincée rapidement à l'eau distillée ensuite cette dernière a été ajoutée sur la lame avec quelques gouttes de fuchsine et laissées agir pendant 1 minute (contre-coloration); la lame a été lavée doucement à l'eau distillée et séchée avec le

papier absorbant. L'observation microscopique a été faite avec une goutte d'huile à immersion à l'objectif 100 (G ×1000).

III. Tests biochimiques

1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme possédant, comme le cytochrome, une coenzyme formé d'un hème incluant un atome de fer ferrique elle joue un rôle dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène généralement. La plupart des bactéries aérobies possèdent une catalase en particulier les bacilles à Gram négatif aérobies. Son absence est un critère d'identification intéressant (Taylor & Achanzar, 1972). La transformation de peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène se fait selon la réaction de dismutation suivante :



Une goutte d'eau oxygénée a été déposée sur une lame. A partir d'un milieu solide, une colonie de chaque bactérie a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et émulsionnée sur la goutte. La formation de bulles d'oxygène indique que la bactérie possède une catalase, alors que l'absence des bulles d'oxygène montre que la bactérie est dépourvue de cette enzyme.

2. Recherche de l'oxydase

Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet « l'indophénol » (Tarrand et Gröschel, 1982).

Un disque imprégné a été déposé sur une lame, puis il a été imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile. À partir d'un milieu solide, une colonie de chaque bactérie a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et déposée sur le disque. L'apparition d'une tache violette indique que la bactérie possède la cytochrome-oxydase, tandis que l'absence d'une tache violette indique que la bactérie est oxydase négative.

3. Réduction des nitrates

La nitrate réductase est une enzyme présente principalement chez les bactéries, les champignons et les plantes. Elle joue un rôle crucial dans le processus de réduction des nitrates. Il existe deux voies exothermiques pour la réduction des nitrates (Joffin et Leryal, 2006) :

- Réduction des nitrates en nitrites (en utilisant une nitrate réductase) selon l'équation suivante : $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
- Réduction de nitrates en diazote (en utilisant une nitrate réductase et une nitrite réductase) selon l'équation suivante : $\text{NO}_3^- + 12\text{H}^+ + 10\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$

À partir d'un milieu solide, une colonie de chaque bactérie a été prélevée à l'aide d'une anse de platine et déposée dans un tube contenant le bouillon nitraté et incubé pendant 4 jours à 28 °C. Après incubation, 2 à 3 gouttes de l'acide sulfanilique et 2 à 3 gouttes de l'alpha-naphthylamine ont été rajoutées. La réduction du nitrate en nitrite par l'enzyme nitrate réductase se traduit par une coloration rose à rouge du milieu. En absence de cette coloration, la poudre de zinc a été ajoutée (épreuve de Zo Bell) comme un agent réducteur capable de réduire les nitrates en nitrites. L'apparition d'une coloration rose à rouge indique que les nitrates ont été réduits en nitrites sous l'action du zinc donc la bactérie est nitrate réductase négative. L'absence de la coloration rose montre que les nitrates ont été réduits par la bactérie au-delà du stade nitrite en N₂ (stade azote gazeux).

4. Mise en évidence de la voie d'attaque du glucose

Les bactéries peuvent utiliser les glucides par deux voies métaboliques différentes : une voie oxydative et une voie fermentative. Pour étudier la voie d'attaque d'un glucide on utilise des milieux contenant un seul glucide et un indicateur de pH (Joffin et Leyral, 2006).

Le milieu MEVAG (sans sucre) a été placé dans un bain marie pendant 20 min. Après refroidissement à une température de 45 à 50 °C, Un volume précis de la solution de glucose stérile a été ajouté dans chaque tube pour avoir une concentration finale de 1 %. Deux tubes ont étéensemencés par la même suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur par une piqûre centrale, quelques gouttes d'huile de vaseline ont été ajoutées à l'un des deux tubes pour créer des conditions d'anaérobiose. Tous les tubes ont été incubés pendant 4 jours à 28 °C.

L'apparition d'un virage de couleur dans le tube qui ne contient pas l'huile de vaseline (tube ouvert) montre que la bactérie ayant un métabolisme oxydatif, si le virage est apparu dans le tube qui contient l'huile de vaseline (tube fermé) cela montre que la bactérie ayant un métabolisme fermentatif. Alors que le changement de l'indicateur de pH dans les deux tubes révèle un métabolisme fermentatif, L'absence de ce changement indique un métabolisme inerte.

5. Mise en évidence de la mobilité bactérienne

La mobilité est un caractère morphologie important pour la survie de la bactérie. Cette étude est généralement réalisée dans un milieu mannitol mobilité ou par un examen à l'état frais.

Le milieu mannitol-mobilité est utilisé pour l'identification présomptive des entérobactéries, basé sur la fermentation du mannitol. Il contient le rouge de phénol comme indicateur de pH (Chapman, 1944). Chaque tube a étéensemencé par la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur, l'ensemencement se fait par piqure centrale puis les tubes ont été incubés pendant 4 jours à 28 °C. L'utilisation du mannitol par la bactérie se traduit par le virage du rouge de phénol au jaune (mannitol positif). Dans le cas où il n'y a pas un virage la bactérie est dite mannitol négative. La croissance autour de la piqure centrale indique que la bactérie est immobile, alors que lorsqu'elle est dans tous le milieu cela veut dire que la bactérie est mobile.

6. Le type respiratoire

Pour ce test la gélose viande-foie (VF) a été utilisée dans laquelle un gradient de concentration en O₂ a été créé. Le milieu (conditionné dans des tubes étroits) a été régénéré dans un bain marie pendant 30 min à 100 °C puis refroidi à 45 °C. À l'aide d'une pipette Pasteur, chaque tube a étéensemencé par une piqure centrale et remontée en spirales serrées. Après solidification de la gélose, tous les tubes ont été incubés pendant 4 jours à 28 °C.

La détermination du type respiratoire est basée sur la position exacte de la culture dans le tube c'est-à-dire :

- Si la culture est seulement située en haut du tube cela signifie que la bactérie est **aérobie stricte**.
- Alors que lorsqu'elle est située uniquement au fond du tube cela veut dire que la bactérie est **anaérobie stricte**.
- Lorsque le développement bactérien est dans tout le tube (de la surface jusqu'à la profondeur) mais la croissance est plus bonne en surface cela signifie que la bactérie est **aérobie anaérobie facultative**.
- Si cette croissance se manifeste dans tous le tube mais elle est uniforme ou homogène partout dans le tube cela signifie que la bactérie est **anaérobie aéro-tolérante**.
- Lorsque la croissance n'aura lieu ni en surface ni en profondeur, elle aura lieu uniquement dans une zone où il y a une faible quantité en oxygène, la bactérie est dite **micro-aérophile**.

7. Activité pectinolytique

Les pectinases catalysent la dégradation des polysaccharides pectiques en molécules plus simples comme les acides galacturoniques. Les pectinases se trouvent dans les bactéries, les champignons, les levures, les plantes et les insectes (Shrestha *et al.*, 2021). La recherche de la pectinase permet de savoir si les bactéries ont la capacité de dégrader la paroi cellulaire végétale et pénétrer à l'intérieur (Menendez *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017).

La pectinase a été recherchée sur le milieu de Soares *et al.* (1999) qui est un milieu gélosé contenant 1 % de pectine (Annexe 1). Le milieu a étéensemencé par des isolats bactériens et incubé à 28 °C pendant 5 jours. Après incubation, les boîtes ont été inondées par une solution d'iode. L'apparition d'un halo clair autour des colonies montre que la bactérie ayant une activité pectinolytique (pectinase positive), tandis que l'absence de ce halo indique l'absence de l'activité pectinolytique (pectinase négative).

Chapitre 3

Résultats et discussion

I. Etude macroscopique

Tous les isolats bactériens obtenus ont des aspects différents, ils sont capables de pousser sur le milieu LMG201 à 28 °C pendant 24 H ou parfois plus. La taille des colonies est majoritairement moyenne, certaines d'entre elles ont une taille petite ou grande. La forme des colonies est circulaire avec un aspect de la surface lisse, de couleur beige. Les colonies sont soit opaques ou translucides, de consistance crémeuse ou muqueuse (Figure 6). La description des colonies est considérée comme première étape d'identification bactérienne. Les travaux d'Arora *et al.* (2014) donnent des variétés morphologiques des isolats endophytiques ce qui est en accord avec nos résultats.



Figure 6. Aspect des colonies de la souche (23) sur le milieu LMG 201 après 72 H d'incubation.

II. Etude microscopique

L'observation microscopique après coloration de Gram montre que certaines souches sont sous forme des coccobacilles ou bacilles à Gram négatif (Figure 7). Les résultats sont compatibles avec ceux trouvés par Arora *et al.* (2014) où la plupart des souches appartiennent au groupe des bactéries Gram négatifs.

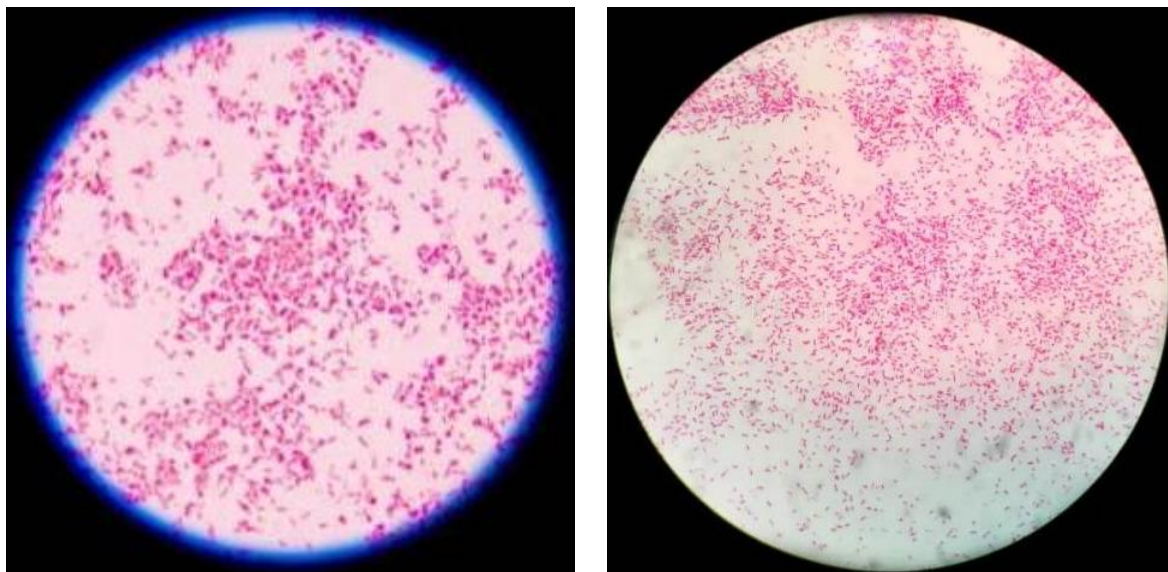


Figure 7. Observation microscopique des bactéries après coloration de Gram.
À gauche : Coccobacilles à Gram négatif. À droite : Bacilles à Gram négatif.

III. Tests biochimiques

1. Recherche de la catalase

L'apparition d'effervescence lors de la mise en contact des colonies avec l'eau oxygénée (H_2O_2) révèle la présence de la catalase. Après avoir effectué le test, la plupart des souches ont montré une activité de la catalase à l'exception des isolats (8) et (13) qui sont exposés à l'activité génotoxique exercée par la molécule (H_2O_2) qui produit des radicaux hydroxyles qui provoquent des lésions de l'ADN (Juven et Pierson, 1996) (Figure 8). Ces résultats sont compatibles avec ceux trouvés par Shah *et al.* (2021). Ils ont montré que quatre des cinq souches endophytiques isolées du blé ont donné des résultats positifs vis-à-vis de l'activité de la catalase.

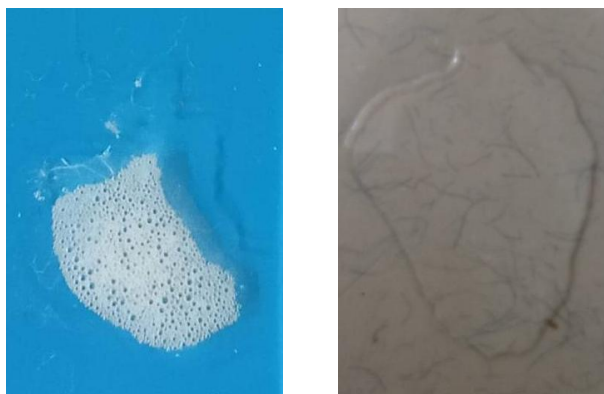


Figure 8. Résultats du test de la catalase.
À gauche : Catalase positif. À droite : Catalase négatif

2. Recherche de l'oxydase

Les résultats obtenus montrent que toutes nos souches bactériennes sont oxydase positive (Figure 9), cela indique que ces bactéries sont capables de produire l'enzyme cytochrome-oxydase qui catalyse la réaction de réduction de dioxygène. Dans leur étude sur six isolats endophytiques isolées à partir des mangroves, Gayathri et Muralikrishnan (2013) ont révélé la présence de cette enzyme chez tous les isolats.



Figure 9. Résultat positif de test d'oxydase.

3. La réduction des nitrates

Ce test montre que tous nos isolats sont nitrate réductase positive sans exception. Treize d'entre elles ont montré une réduction assimilatrice « NO_3^- en NO_2^- ». Une seule souche a montré l'absence de la coloration rose, et après l'ajout de la poudre de zinc la couleur n'a pas changé, cela signifie que les nitrates ont été réduits en azote gazeux (Figure 10). Ces résultats sont accords avec ceux de Benkahoul *et al.* (2017).

Dans les milieux biologiques, la conversion des ions NO_3^- en ions NO_2^- se produit uniquement sous l'action d'une enzyme appelée nitrate réductase, qui est présente dans tous les organismes capables de métaboliser le nitrate, y compris les plantes, les champignons, certains types de levures et les bactéries (Idrissi, 2006). L'excès de nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des bactéries aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective et diminue le pouvoir fixateur d'azote (Fageria, 1968).

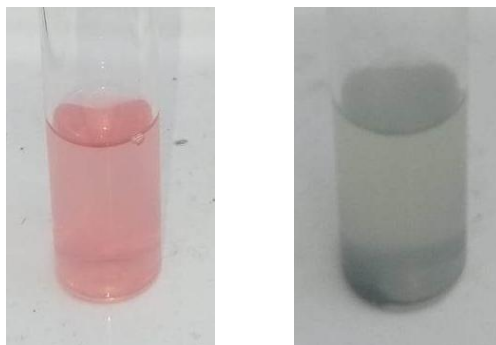


Figure 10. Résultats positifs du test de la nitrate réductase.
À gauche : stade nitrite. À droite : stade azote gazeux

4. La mise en évidence de la voie d'attaque du glucose

Après incubation, les résultats montrent qu'il y a une acidification dans les deux tubes de chaque souche d'où le virage de l'indicateur de pH du rouge au jaune, à l'exception des souches (14) et (57), y a pas de virage au niveau du tube fermé (en anaérobiose) (Figure 11).

L'acidification du milieu est révélée par l'indicateur de pH dans les deux tubes (Tube fermé et tube ouvert), signifiant que les bactéries dégradent le glucose en aérobiose et en anaérobiose, donc par voie fermentative. Alors que pour les souches (14) et (57), l'acidification du milieu est révélée uniquement en présence de dioxygène (tube ouvert), cela veut dire que les bactéries dégradent le glucose en aérobiose uniquement, donc par voie oxydative. L'utilisation du glucose signifie que la bactérie est capable de le faire pénétrer au niveau du cytosol dans lequel il subit une série de réactions qui finissent par la libération de l'ATP. Les résultats rapportés par Brown (1973) montrent une variété métabolique de la voie de dégradation du glucose par les souches testées dont la plupart suivent la voie oxydative.

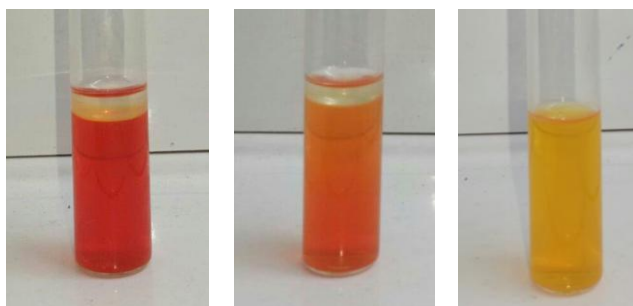


Figure 11. Résultats du test la voie d'attaque du glucose.
À gauche : la bactérie ne peut pas dégrader le glucose en anaérobiose. Au milieu et à droite :
dégradation du glucose

5. Type respiratoire

Après incubation, les résultats montrent que quatre souches (3, 14, 47 et 57) prennent le mode de respiration aérobie stricte cela indique que les bactéries ont besoins d'oxygène moléculaire, ce dernier joue le rôle d'un accepteur final d'électrons pendant la respiration. Le reste de souches n'ont donné aucune croissance bactérienne même après plusieurs répétitions.

6. Mise en évidence de la mobilité bactérienne

Les résultats obtenus montrent qu'y ai une acidification du milieu d'où le virage de l'indicateur de pH le rouge phénol au jaune. Cela s'explique par la fermentation du mannitol par presque toutes les bactéries endophytes, elles peuvent donc utiliser le mannitol comme seule source de carbone. Par contre les souches (1) et (3) présentent des résultats négatifs (pas de virage de l'indicateur de pH) donc elles sont dites mannitol négatif (Figure 12). Cela signifie que ces deux bactéries n'utilisent pas le mannitol comme source de carbone. En ce qui concerne la mobilité, toutes les souches sont immobiles et cela dû à la croissance au niveau de la pique centrale uniquement. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Benkahoul *et al.* (2017) où la majorité des souches sont immobiles et dégradent le mannitol partiellement.

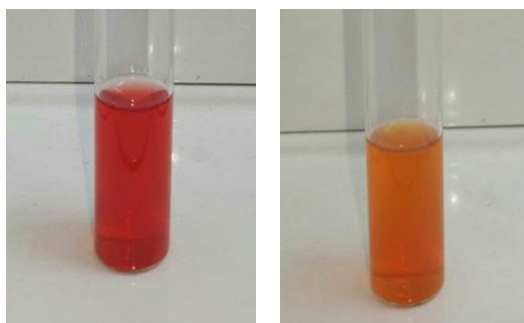


Figure 12. Résultats du milieu Mannitol-mobilité.
À gauche : mannitol (-). À droite : mannitol (+), immobile.

7. Activité pectinolytique

Les résultats de la mise en évidence de l'activité pectinolytique montrent que toutes les souches possèdent cette activité d'où l'apparition d'un halo blanc autour des colonies (Figure 13). Ces résultats sont en accord avec ceux de Khan *et al.* (2022) qui ont trouvé que l'analyse du profil enzymatique a révélé que la production de la pectinase était la plus dominante chez la plupart des isolats par rapport aux autres activités.

La dégradation de la paroi végétale est réalisée par la synergie de plusieurs activités enzymatiques parmi lesquelles l'activité pectinolytique (polygalacturonase), qui agit sur les substances pectiques exactement sur la partie galacturonique en améliorant la porosité de la paroi ce qui permet la pénétration des bactéries (Menendez *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017).

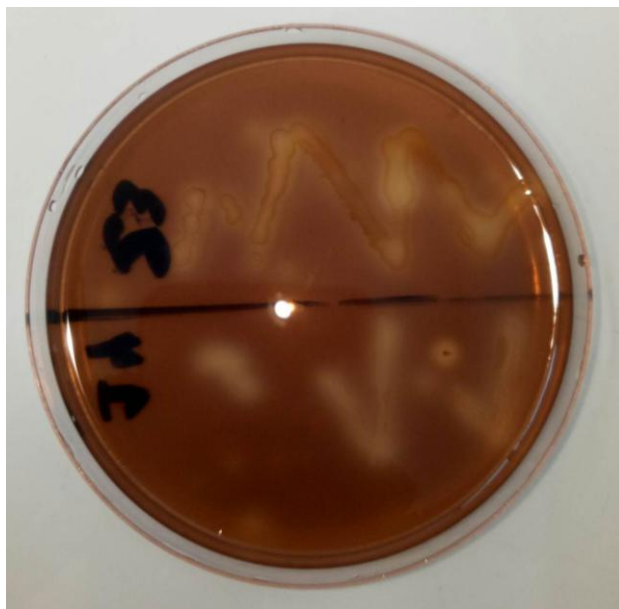


Figure 13. Activité pectinolytique chez les isolats 14 et 53.

Conclusion
&
perspectives

L'axe de notre recherche couvre l'étude des bactéries endophytes non rhizobiennes rencontrés dans les nodosités racinaires de la légumineuse du genre *Pisum sativum* L. Cette recherche a permis l'identification et la caractérisation phénotypique des isolats grâce à une multitude des tests physiologiques et biochimiques.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à l'examen macroscopique et l'aspect des colonies apparues après environ 72 H d'incubation à 28 °C a montré que les quatorze isolats présentent une variété morphologique sur le milieu LMG 201.

L'identification des souches bactériennes par la coloration de Gram a montré que ce sont des bacilles et des coccobacilles à Gram négatif.

Il est intéressant de signaler que la plupart des souches sont capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène grâce à la présence de la catalase. La totalité de ces isolats ont la capacité de réduire les nitrates et cela a été confirmé par les résultats obtenus. Toutes nos bactéries endophytes ont montré également la présence d'une oxydase.

L'utilisation du glucose et du mannitol comme seule source de carbone par ces souches a montré une diversité dans leur métabolisme glucidique. Toutes les souches sont par contre immobiles.

Quatre isolats sont aérobies stricts ce qui prouve que le dioxygène est un facteur essentiel dans leurs fonctions vitales. Le reste n'a pas poussé dans le milieu VF.

La sécrétion de l'enzyme pectinase chez toutes les souches montre qu'elles ont la capacité de pénétrer la paroi de leurs plantes hôtes.

Tous les repères des tests phénotypiques employés nous amène à déduire que les quatorze souches sont des bacilles à Gram négatif non *Enterobacteriaceae*.

L'objectif de ce travail a été en grande partie atteint, bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues n'aient pas pu être réalisées en raison de l'indisponibilité du matériel et de moyens (tel que la galerie API 20NE).

L'ouverture de nouvelles perspectives dans le but de rentabiliser d'avantage nos investigations serait judicieuse :

- La détermination du statut taxonomique des isolats de cette étude par d'autres techniques phénotypiques et moléculaires.

- Examiner le pouvoir de ces bactéries endophytes à contribuer dans la bioprotection des plantes hôtes contre certains agents pathogènes.

Références bilinguistiques

- Andrews J. H., & Harris, R. F., 2000.** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*. 38: 145-180.
- Appelbaum P. C., Stavitz J., Bentz M. S. & Von kuster L. C., 1980.** Four methods for identification of gram-negative non fermenting rods: organisms more commonly encountered in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 12(2): 271-278.
- Arnold A. E., 2007.** Understanding the diversity of foliar endophytic fungiendophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 21(2-3): 51–66.
- Arnold A. E., Lutzoni F., 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*. 88(3): 541–549.
- Arora S. & Rao G., 2014.** Isolement et caractérisation des bactéries endophytes colonisant les halophytes et autres espèces végétales tolérantes au sel du Gujarat côtier. *Journal Africain de Recherche en Microbiologie*. 8(17): 1779-1788.
- Atlas R. M., 2005.** Handbook of Microbiological Media. 2ème édition : Parks L. C, Tomaison, 672.
- Azevedo J. L., Maccheroni M. J., Pereira J. O., & Araujo W. L., 2000.** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(1) : 26.
- Barthélemy M., 2019.** *Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers*. Thèse de doctorat : Chimie des substances naturelles. Université de Sorbonne Paris. 194p.
- Ben mbarek K., Boubaker M. & Hannachi C., 2012.** Modélisation du rendement grain du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type « kabuli » sous les conditions édapho-climatiques du semi-aride supérieur Tunisien. *Revue marocaine des sciences agronomiques et vétérinaires*. 2: 37-49.
- Benkahoul M., Talhi A. & Boulefkhad N., 2017.** Bactéries des environnements chauds Algériens : isolement et mise en évidence de la production d'hydrolase. *Sciences & Technologie*. (45) : 25-35.

- Bouznard A., 2016.** *Isolement et caractérisation des rhizobactéries libres et endophytes (Bacillus sp et pseudomonas sp) : étude de leur pouvoir protecteur vis-à-vis de Fusarium oxysporum f. sp lycopersici et leur caractères liés à la promotion de la croissance des plantes.* Thèse de doctorat : Microbiologie. Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem. 229.
- Brooks K. A., Jens M. & Sodeman T. M., 1974.** A Clinical Evaluation of the API Microtube System for Identification of Enterobacteriaceae. *The American journal of medical technology.* 40(2): 55-61.
- Brosius J., Palmer M. L., Kennedy P. J., Noller H. F., 1978.** Complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Biochemistry.* 75(10): 4801-4805.
- Brown W. J., 1976.** One-Tube Test for Determining Oxidative or Fermentative Metabolism of Bacteria. *APPLIED MICROBIOLOGY.* 27(4): 811-813.
- Çakir O., Uçarlı C., Tarhan C., Pekmez M. & Turgut-Kara N., 2019.** Nutritional and health benefits of legumes and their distinctive genomic properties. *Food Science Technology.* 39(1): 1-12.
- Chapman G. H., 1944.** La fiabilité de la gélose bromthymol-bleu lactose et de la gélose bacto phénol-rouge mannitol pour l'isolement des staphylocoques pathogènes. *Journal of bactériologie.* 48(5) : 555–557.
- Dahal P., 2023.** Test d'oxydase - Principe, procédure, types, résultats, utilisations. [En ligne]. (consulté le 13 juin 2023). Disponible sur :
- Dekak A., Menasria T., Benhizia Y. & Chenchouni H., 2020.** Bactéries endophytes passagères associées aux nodules de *Genista cinerea* poussant dans les zones arides d'Afrique du Nord. *Rhizosphère.* 14: 100-205.
- Dixon R. A. & Sumner L. W., 2003.** Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology.* 131(3): 878-885.
- Dudeja S. S., Giri R., Saini R., Suneja-Madan P., & Kothe E., 2012.** Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology.* 52: 248- 260.

- Egamberdieva D., Wirth S. J., Alqarawi A. A., Abd_Allah E. F. & Hashem A., 2017.** Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology* *Front Microbiol.* 8: 2104.
- Fageria N. K., 1968.** Functions of nitrogen in crop plants. *Nitrogen management in crop production*. 1ère édition. Brazil: Taylor & Francis, 318.
- Flandrois J. P., 1997.** Physiologie et croissance. *Bactériologie médicale*. Lyon : Presses universitaires de Lyon (PUL), 30.
- Frank A. C., Saldierna Guzmán J. P., & Shay J. E., 2017.** Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*. 5(4) : 70.
- Fraval A., 1969.** La jaunisse apicale du pois : connaissances actuelles sur l'écologie de cette maladie transmise par aphides. *Bel-INRAe*. 1(3) : 357-369.
- Gayathri P. & Muralikrishnan V., 2013.** Isolation and characterization of Endophytic Actinomycetes from mangrove plant for antimicrobial activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(11): 78-89.
- Giraud E., 2007.** Symbiose rhizobium/ légumineuse : un nouveau sésame. *Medical Sciences*. 23 : 663–666.
- Grondeau C., 1992.** *La graisse bactérienne du pois protéagineux due à Pseudomonas syringae pv. Pisi (Sackett) : identification, épidémiologie et méthodes de lutte*. Thèse de doctorat : Sciences agronomiques. Toulouse.
- Guersses k. & Harrat I., 2018.** *Effet du stress salin sur la germination et la croissance de quelques variétés de petit pois (Pisum sativum L)*. Mémoire de Master : Phytopharmacie et protection des végétaux. Université 8 Mai 1945 Guelma. 52p.
- Hagedorn, D.J. 1984.** Compendium of pea diseases. Amer. Phytoph. Soc. Univ. Of Wisconsin, Madison, USA p. 25-29.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F. & Kloepper J. W., 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 895- 914.
- Hardoim P. R., van Overbeek L. S. & van Elsas J. D., 2008.** Propriétés des endophytes bactériens et leur rôle proposé dans la croissance des plantes. *Trends in Microbiology*. 16 (10) : 463–471.

- Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Döring M. & Sessitsch A., 2015.** The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *Microbiol Mol Bio Rev.* 79(3): 293–320.
- Hugh R. & Leifson E., 1953.** la signification taxonomique du métabolisme fermentatif versus oxydatif des glucides par différentes bactéries Gram négatives. *Journal of Bacteriology.* 66(1): 24–26.
- Idrissi L., 2006.** Nitrates et nitrites Polluants qui menacent la santé et l'environnement. *les technologies de laboratoire.*1(1): 10-14.
- Imran A, Khan Z.S, Shomaila S, Shaheen S., 2019.** Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiology research.* 221: 36-49.
- Joffin J. N. & Leyral G., 2006.** Microbiologie technique tome 1. 4^{ème} édition. Espagne : Canope CRDP de Bordeaux, Tomaison, 386. (Biologie technique).
- Juven B. J. & Pierson M. D., 1996.** Effets antibactériens du peroxyde d'hydrogène et méthodes de détection et de quantification. *Journal of Food Protection.* 59(11):1233-1241.
- Kandel S. L., Joubert P. M & Doty S. L., 2017.** Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms.* 5(4): 77–103.
- Khan T., Alzahrani O. M., Sohail M., Hassan k. A., Gulzar S., Rehman A. U., Mahmoud S. F., Alswat A. S. & Abdel-Gawad C. A., 2022.** Profilage enzymatique et identification des bactéries endophytes et rhizosphériques isolées d'*Arthrocnemum macrostachyum*. *Microorganismes.* 10(11): 2112.
- Lamoril J., Ameziane N., Deybach J. C., Bouizegarène P. & Bogard M., 2008.** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* 23(5): 260–279.
- Lévesque D. & Trudeau L., 1994.** diététistes/nutritionnistes. À la découverte des légumineuses. *Plein Soleil, Diabète Québec.* 110-116

- LPWG 2017.** A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny: phylogeny: The Legume phylogeny Working Group (Group (LPWG). *TAXON*, 66:44-77.
- Ma Y., Rajkumar M., Zhang C. & Freitas H., 2016.** Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmentalof Environmental Management*. 174: 14–25.
- Maheshwari R., Bhutani N. & Suneja P., 2020.** Isolement et caractérisation de l'ACC Deaminase Producing Endophytic Bacillus mojavensis PRN2 à partir de *Pisum sativum*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 18 (2) : 2308.
- Mekhaldi D., 2020.** *Identification et caractérisation de la résistance du pois face à la fusariose vasculaire*. Thèse de doctorat : Phytopathologie. Université Blida 1. 152p.
- Menéndez E., Garcia-Fraile P. & Rivas R., 2015.** Applications biotechnologiques des cellulases bactériennes. *AIMS Bioengineering*. 2(3): 163-182.
- Mengistu A. A., 2020.** Endophytes : colonisation, comportement et leur rôle dans le mécanisme de défense. *International Journal of Microbiology*. 8.
- Nawed A. & Ramesh C., 2015.** Endophytic bacteria: Optimizaton of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 8(4):233-238.
- Ouazib M., 2017.** *Effet de traitements sur les paramètres nutritionnels et fonctionnels du pois chiche produit localement : impact sur les propriétés rhéologiques, physicochimiques et sensorielles de pain à base de pois chiche*. Thèse de doctorat : Sciences des aliments. Université A. Mira-Bejaia. 114p.
- Palleroni N.J., 2008.** The road to the taxonomy of Pseudomonas. In Corneli P (eds). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Belgium: Caister Academic PressAcademic Press. pp. 1–18.
- Papavizas G. C., Ayers A. A., 1974.** Aphanomyces species and their root diseases in pea and sugarbeet. United States. Tomaison, 158.

- Petrini L.E., Petrini O., & Laflamme G., 1989.** Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. *Phytoprotection*. 70: 97-103.
- Preyanga R., Anandham R., Krishnamoorthy R., Senthilkumar M., Gopal N. O., Vellaikumar A. & Menna S., 2021.** *Arachis (Arachis hypogaea)* nodule rhizobium et diversité bactérienne endophyte passagère cultivable et leur impact sur la promotion de la croissance des plantes. *Rhizosphère*. 17: 2452-2198.
- Puigmal Y., 2016.** Comparaison des différentes techniques d'identification microbienne dans le cadre des contrôles environnementaux [en ligne]. (consulté le 3/06/2023). Disponible sur :
- Rakotonirina A., 2021.** *Apport de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la surveillance des moustiques vecteurs d'arbovirus*. Thèse de doctorat : Biologie des populations et écologie. 53p.
- Reinhold-Hurek B., Maes T., 2006.** An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(2): 181–188.
- Reynolds J., 2021.** Bacterial Colony Morphology. [en ligne]. (consulté le 27 Avril 2023). Disponible sur : https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/08%3A_Bacterial_Colony_Morphology
- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen Orozco-Mosqueda M. & Glick B. R., 2016.** Endophytes bactériens favorisant la croissance des plantes. *Microbiological Research*. 183: 92–99.
- Schulz B., Boyle C. & Sieber T., 2006.** Microbial Root Endophytes. [Enligne]. Disponible sur « <https://books.google.dz/books> » consulté le 26 Avril 2023.
- Shah D., Khan M. S., Aziz S., Ali H. & Pecoraro L., 2021.** Caractérisation moléculaire et biochimique, activité antimicrobienne, tolérance au stress et effet favorisant la croissance des plantes des bactéries endophytes isolées des variétés de blé. *Microorganismes*. 10(1): 21.

- Shahzad R., Khan A. L., 2018.** What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Frontiers in Plant Science* *Front Plant Sci.* 23(9): 24.
- Shrestha S., Khatiwada J. R., Zhang X., Chio C., Chen F., Han S., Chen X., Qin W. & Kognou A., 2021.** Criblage et identification moléculaire de nouvelles bactéries pectinolytiques du sol forestier. *Fermentation.* 7(1) : 40.
- Silva-Hughes A. F., Wedge D. E., Cantrell C. L., Carvalho C. R., Pan Z., Moraes R. M., Madoxx V. L. & Rosa L. H., 2015.** Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research.* 175: 67–77.
- Soares R., Trejo J., Lorite M. G., Figueira E., Sanjuán J. & Videira E Castro I., 2020.** Diversity, Phylogeny and Plant Growth Promotion Traits of Nodule Associated Bacteria Isolated from *Lotus parviflorus*. *Microorganismes.* 8: 499.
- Tarrand J. J. & Gröschel D. H., 1982.** Test rapide d'oxydase modifiée pour les isolats bactériens à oxydase variable. *Journal of Clinical Microbiology.* 16(4) : 772 – 774.
- Taylor W. I. & Achanzar D., 1972.** Test de catalase comme aide à l'identification des entérobactéries. *Applied Microbiology.* 24(1) : 58–61.
- Vijay C. V., Alan C. G., 2014.** Advances in Endophytic Research. [En ligne]. Disponible sur « <https://books.google.dz/books> » consulté le 26 Avril 2023.
- Yang B., Wang X.M., Ma H. Y., Yang T., Jia Y., Zhou J. & Dai C. C., 2015.** Fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* affects nitrogen transformation processes and related microorganisms in the rice rhizosphere. *Frontiers in Microbiology* *Front Microbiol.* 6: 982.
- Zhang H. W., Song Y. C., & Tan R. X., 2006.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* *Nat Prod Rep.* 23 (5): 753–771.
- Zhou M., Guo P., Wang T., Gao L., Yi H., Cai C., Gu J. & Lu X., 2017.** Extraction métagénomique de microbes pectinolytiques et d'enzymes d'une communauté microbienne de compost adaptée au marc de pomme. *Biotechnologie pour les biocarburants volume.* 10: 198.

Zohary D. & Hopf M., 1988. Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. 3^{ème} édition. Oxford University. 316.

Web 1 <https://fr.dreamstime.com/parties-d-usine-morphologie-pois-des-foies-fleurs-feuilles-vert-syst%C3%A8me-racine-fond-blanc-image126171904>

Web 2 <https://ephytia.inra.fr/fr/C/22545/Vigi-Semences-Pseudomonas-syringae-pv-pisi-Graisse-bacterienne-du-pois>

Web 3 <https://www.agrifind.fr/alertes/pois-de-printemps/pois-de-printemps-aphanomyces/>

Web 4 <https://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/CropHosts/Pea.htm>

Web 5

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fonlinelibrary.wiley.com%2Fdoi%2F10.1111%2Fflam.12855&psig=AOvVaw0u_Oqeibb_xSzd9bWRWUGl&ust=1683368817213000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwiRuaPU-93-AhWysCcCHcSHBqwQr4kDegUIARC-AQ

Annexe

Le milieu LMG 201 (Atlas, 2005)

- Mannitol.....10 g
- Extrait de levure.....1 g
- Glutamate de sodium.....0.5 g
- KH_2PO_40.5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.1 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$40 m
- FeCl_34 mg
- Agar.....20 g
- Eau distillée.....1 L
- Le pH est ajusté à 6.8
- Autoclavage du milieu à 120 °C pendant 20 minutes.

Le milieu de Soares *et al* (1999)

- Pectine.....5 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$1,4 g
- K_2HPO_46 g
- KH_2PO_42g
- MgSO_40,1g
- Agar.....18mg
- Eau distillée.....1L
- Le pH est ajusté à 6.8
- Autoclavage du milieu à 120 °C pendant 20 minutes.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Microbiologie

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

Identification phénotypiques de quelques bactéries endophytes isolées du pois

Résumé

Le pois (*Pisum sativum* L.) est l'un des genres les plus connus parmi les légumineuses, appartenant à la famille des Fabacées qui forme une association symbiotique avec les bactéries du sol connues sous le nom de « rhizobium », mais dans certains cas les bactéries endophytes non rhizobiennes peuvent se rencontrer au sein des nodules racinaires de cette plante. Le but de cette étude est d'identifier ces bactéries. La démarche a été réalisée selon les caractères morphologiques et biochimiques en se basant sur une étude macroscopique et microscopique, les tests de catalase, oxydase, la nitrate réductase, la voie d'attaque du glucose, le type respiratoire, la mobilité microbienne et l'activité pictinolytique. Les résultats ont montré une diversité parmi les isolats. L'étude macroscopique et microscopique des souches a montré une variété des caractères culturels dans lequel les souches se présentent sous forme des bacilles à Gram négatif. Toutes les données nous conduisent à déduire que les souches sont des bacilles à Gram négatif non *Enterobacteriaceae*.

Mot clés : *Pisum sativum* L., Endophytes, Identification, Non *Enterobacteriaceae*.

Membre du jury :

Présidente du jury : Mme. OULMI L. (Maître de conférences - UFM, Constantine 1).

Encadrante : Mme. GACI M. (Maître de conférences - UFM, Constantine 1).

Examinatrice : Mme. BOUCHLOUKH W. (Maître de conférences - UFM, Constantine 1).

Présentée par : REMOUCHE Esma
SAIH Safa
MOSBAH Zebida

Année universitaire : 2022 - 2023