



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie قسم : ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Écologie et Environnement

Spécialité : Ecologie microbienne

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Caractérisation des bactéries nodulant le genre *Lotus* et *Hippocrepis*
(légumineuse) poussant dans la région de Constantine**

Présenté par : BOUMAZA Lina
MAOUCHE Lina

Le : 13/06/2024

Président : Mme GUERGOURI Ibtissem (M.C.B - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Mr BENCHIZIA Yacine (Professeur - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s): Mr CHABBI Rabah (M.A.A - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024

Remerciement

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre professeur, Monsieur **Benhizia Yacine**, pour son encadrement attentif et bienveillant tout au long de notre parcours dans son laboratoire de recherche (B.M.C). Ses conseils, son soutien et ses orientations ont été d'une valeur inestimable pour notre travail. Nous le remercions également pour sa patience et son dévouement, qui ont grandement contribué à notre réussite.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude aux membres de notre jury, Mme **Guergouri Ibtissem** et Mr **Chabbi Rabah** pour leur temps précieux, leurs remarques constructives et leurs encouragements tout au long de ce parcours. Leur expertise et leurs suggestions ont été essentielles pour améliorer la qualité de notre mémoire.

Nous voulons également adresser nos remerciements à l'ingénieur de laboratoire, Mme **Houda**, qui est devenue bien plus qu'une collègue, mais une véritable amie. Sa disponibilité et son aide ont grandement contribué à notre réussite.

Nos remerciements vont également à nos collègues doctorantes de laboratoire, Mme **Radja** et Mme **Ibtihadj**, pour leur précieux coup de pouce.

Un grand merci également à Dr. **Chabbi** pour ses remarques précieuses. Ses conseils ont été d'une grande valeur ajoutée dans l'amélioration de notre travail.

Enfin, nous tenons à exprimer notre gratitude envers toute l'équipe du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur ambiance de travail stimulante

Dédicace

Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance,

Je dédie ma remise de diplôme et ma joie :

A mon paradis, à la prunelle de mes yeux, à la source de ma joie et mon bonheur, ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin, ma moite **Maman**.

À celui qui m'a fait une femme, ma source de vie, d'amour et d'affection. À mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, à mon prince **papa**.

A mon cher fiancé **Achref** qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

À ma grande sœur **Amira** qui n'as pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

A mes frères **Zakaria** et **Ramzi** pour l'amour qu'ils m'ont réservé.

A mon binôme et mon amie **Lina** pour son entente et sa sympathie.

Lina. M

Dédicace

Au terme de cette longue aventure académique, je prends un moment pour exprimer ma gratitude envers ceux qui ont été des piliers de soutien, des sources d'inspiration et des compagnons de route dans ce voyage. Cette dédicace est une humble reconnaissance de l'impact de chacune de ces personnes sur mon parcours.

*À celui qui a toujours été ma source de force et de sagesse, à celui qui restera éternellement gravé dans mon cœur, à mon **Papa** chéri رحمه الله. Ce travail est dédié à toi, ton souvenir illumine chaque page, ton amour guide chaque mot.*

*À la lumière qui éclaire mes jours sombres, la force qui me guide à travers les défis de la vie. Ce travail est dédié à toi **Mama**, ma source d'inspiration infinie, pour ton amour inconditionnel.*

*À mon frère **Oussema**, mon pilier de force et mon confident.*

*À mes sœurs jumelles **Safa** et **Merwa**, dont la présence lumineuse illumine mon monde de bonheur.*

*À **Lina**, mon binôme et amie, pour ses efforts et sa patience dans cette aventure partagée.*

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet. Vous avez tous, à votre manière, laissé une empreinte indélébile sur cette aventure académique.

À moi-même, pour avoir persévéré à travers les défis, pour avoir gardé la foi et pour avoir travaillé avec détermination. Cette réussite est le fruit de mon dévouement et de ma résilience.

Lina.B

Résumé

Cette recherche a été menée sur quatre souches bactériennes prélevées à partir des nodules racinaires de deux plantes légumineuses sauvages, *Lotus* et *Hippocrepis*, répandues dans la région d'El Merij-Constantine. L'objectif était d'identifier les différentes souches qui nodulaient les deux légumineuses sauvages, ainsi que d'étudier leurs caractéristiques et leur diversité. L'analyse des souches s'est concentrée d'abord sur une analyse morphologique, permettant d'obtenir des colonies homogènes de forme circulaire, avec un contour régulier et une surface légèrement bombée. Ces bactéries se présentaient sous forme de bacilles à Gram négatif. Ensuite, une caractérisation phénotypique a été réalisée, incluant des tests nutritionnels, biochimiques et physiologiques. Bien que cette description demeure partielle, elle fournit des informations précieuses sur la position taxonomique hypothétique des isolats examinés dans cette étude.

Mots clés : *Lotus*, *Hippocrepis*, El Merij-Constantine, caractérisation, Gram, isolats.

Summary

This research was conducted on four bacterial strains isolated from root nodules of two wild leguminous plants, *Lotus* and *Hippocrepis*, widespread in the El Merij-Constantine region. The objective was to identify the different strains that nodulated the two wild legumes, as well as to study their characteristics and diversity. The analysis of the strains initially focused on a morphological analysis, yielding homogeneous colonies of circular shape, with a regular contour and a slightly convex surface. These bacteria appeared as Gram-negative bacilli. Next, a phenotypic characterization was performed, including nutritional, biochemical, and physiological tests. Although this description remains partial, it provides valuable information on the hypothetical taxonomic position of the isolates examined in this study.

Keywords: *Lotus*, *Hippocrepis*, El Merij-Constantine, characterization, Gram, isolates.

ملخص

تم إجراء هذه الدراسة على أربع سلالات بكتيرية تم جمعها من العقد الجذرية لنوعين من النباتات البقولية البرية *Lotus* و *Hippocrepis*، المنتشرة في منطقة المريح-قسنطينة. كان الهدف هو تحديد السلالات المختلفة المكونة للعقد الجذرية نوعي *Hippocrepis* و *Lotus* البقوليات البرية، وكذلك دراسة خصائصها وتنوعها. تركزت التحليلات على تحليل مظهري، مما أتاح الحصول على مستعمرات متجانسة ذات شكل دائري، بحدود منتظمة و سطح مرتفع قليلاً. ظهرت هذه البكتيريا على شكل عصيات سالبة Gram. بعدها تم إجراء وصف مظهري شمل اختبارات غذائية وبيوكيميائية وفسولوجية. على الرغم من أن هذا الوصف لا يزال جزئياً، إلا أنه اعطى معلومات قيمة حول الوضع التصنيفي الافتراضي للعزلات المختبرة في هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية: دراسة وصفية، السلالات، المريح-قسنطينة، *Lotus*, *Hippocrepis*, Gram

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Étude bibliographique	
I.1. Description des relations Sol-Plante-Microorganismes	4
I.1.1. Rhizosphère.....	4
I.1.2. Organismes de la rhizosphère	4
I.1.2.1. Plantes et la rhizosphère.....	4
I.1.2.2. Microorganismes et rhizosphère	5
I.2. La Symbiose.....	6
I.2.1. Généralités	6
I.2.2. Spécificité de la symbiose rhizobia-légumineuse	6
I.2.3. Partenaire végétal.....	7
I.2.3.1. Famille des Fabacées.....	7
I.2.4. <i>Lotus</i>	7
I.2.4.1. Caractères généraux du genre <i>Lotus</i>	7
I.2.4.2. Répartition géographique	8
I.2.4.3. Classification systématique.....	8
I.2.5. <i>Hippocrepis</i>	9
I.2.5.1. Caractères généraux du genre <i>Hippocrepis</i>	9
I.2.5.2. Répartition géographique	9
I.2.5.3 Classification systématique.....	10
I.2.6. Partenaire bactérien.....	10
I.2.6.1. Caractères généraux	10
I.2.6.2. Caractères biochimiques et physiologiques	11
I.2.6.3. Caractères génétiques.....	11
I.2.7. Nodulation.....	11
I.2.7.1. Nodule.....	11
I.2.7.2. Processus de nodulation	12
I.3. Cycle de l'azote.....	15
I.3.1. Fixation biologique de l'azote.....	15
I.3.1.1. Les fixateurs libres	16
I.3.1.2. Les fixateurs symbiotiques.....	16
I.3.1.3. Mécanisme moléculaire de la fixation	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Présentation de la zone de prélèvement	18
II.1.1. Situation géographique	18
II.2. Isolement des bactéries à partir des nodules	18
II.2.1. Collecte des nodules	18
II.2.2. Conservation des nodules	19
II.2.3. Isolement des souches à partir des nodules.....	20
II.2.4. Stérilisation des nodules	20
II.2.4.1. Test de stérilisation	20
II.2.4.2. Ecrasement des nodules	21
II.2.5. Isolement des souches.....	21
II.3. Caractères morphologiques et culturaux.....	21
II.3.1. Principaux milieux de culture utilisés.....	21
II.3.2. Purification des isolats	22
II.3.3. Examen microscopique.....	22
II.3.4. Examen de la mobilité	22
II.3.5. Observation des colonies et conservation des isolats.....	23
II.4. Caractérisation phénotypique des isolats	23
II.4.1. Test de bleu Bromothymol	23
II.5. Tests nutritionnels.....	23
II.5.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone	23
II.6. Tests biochimiques	24
II.6.1. Réduction des nitrates	24
II.6.2. Galerie biochimique API 20 E	24
II.6.3. Test de l'Oxydase	24
II.7. Tests physiologiques.....	24
II.7.1. Effet de la température.....	24
II.7.2. Effet du pH	25

Chapitre III : Résultats et discussion

Introduction	27
III.1. Test de stérilisation.....	27
III.2. Caractères morphologiques et culturaux	27
III.2.1. Croissance sur YMA	27

III.2.2. Croissance sur YMA+ RC.....	28
III.2.3. Croissance sur GPA+BCP	29
III.2.4. Aspect microscopique.....	29
III.2.5. Mobilité des souches	30
III.3. Caractérisation phénotypique des isolats.....	30
III.3.1. Test de Bleu de Bromothymol.....	30
III.3.2. Tests nutritionnels	31
III.3.2.1. Assimilation de la source de carbone	31
III.3.3. Tests biochimiques	32
III.3.3.1. Réduction des nitrates.....	32
III.3.3.2. Galerie biochimique API 20 E.....	33
III.3.3.3. Test de l'Oxydase	35
III.3.4. Tests physiologiques	35
III.3.4.1. Effet de température	35
III.3.4.2. Effet du pH	35
Conclusion	37
Références bibliographiques	39
Annexes	

Liste des figures

Figure 01 : la légumineuse du genre <i>Lotus</i> (El Mridj. Constantine 2024).....	8
Figure 02 : La légumineuse du genre <i>Hippocrepis</i> (El Mridj.Constantine2024).....	9
Figure 03 : Forme des nodules : (a) Nodules de <i>Lotus</i> . (b) Nodules d' <i>Hippocrepis</i>	12
Figure 04 : La perception et la transmission du signal bactérien pendant la symbiose (Dalla et al.2015)	14
Figure 05 : Formation du cordon d'infection et sa progression (D'après Oldroyd et al. 2010)....	14
Figure 06 : Formation des symbiosomes et libération des bactéries (Selami, 2017).....	14
Figure 07 : Processus d'infection de la racine et mise en place du nodule chez <i>Medicago truncatula</i> (Selami, 2017).....	15
Figure 08 : Schéma simplifié du mécanisme de fixation symbiotique de N ₂ (Benaissa,2022)....	17
Figure 09 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	18
Figure 10 : Collecte des nodules.....	19
Figure 11 : (a) Tubes utilisés pour la conservation des nodules dans notre étude (b) Conservation des nodules (Vincent, 1970).	20
Figure 12 : Isolement par la méthode des trois quadrants.....	21
Figure 13 : Carte de turbidité de Wickerham (1950).....	25
Figure 14 : Absence des microorganismes autour de nodule désinfecté.....	27
Figure 15 : Aspect des colonies sur YMA. (a) : genre <i>Hippocrepis</i> (b) : genre <i>Lotus</i>	28
Figure 16 : Croissance sur milieu YMA+ RC (a) : genre <i>Hippocrepis</i> (b) : genre <i>Lotus</i>	28
Figure 17 : Alcalinisation sur milieu GPA+BCP (a) : genre <i>Hippocrepis</i> (b) : genre <i>Lotus</i>	29
Figure 18 : Observation microscopique des bactéries isolées (G×100) (a) : genre <i>Hippocrepis</i> (b) : genre <i>Lotus</i>	29
Figure 19 : Résultat de Mannitol mobilité	30
Figure 20 : Isolat à croissance rapide sur milieu YMA+BTB (a) : genre <i>Hippocrepis</i> (b) : genre <i>Lotus</i> (c) : Milieu YMA+BTB.....	31
Figure 21 : Assimilation des sucres par les souches testées.....	32
Figure 22 : réduction de nitrate négatif (-).....	32
Figure 23 : Galerie biochimique Api 20 E (a) : genre <i>Lotus</i> (b) : genre <i>Hippocrepis</i>	32
Figure 24 : Disque oxydase négatif (-).....	34
Figure 25 : Effet de la température sur la croissance des souches.....	35

Figure 26 : Effet du pH sur la croissance de souches testées (a): genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus*.37

Liste des tableaux

Tableau 01 : Le groupe des souches testées utilise les sucres comme source de carbone.....	31
Tableau 02 : Galerie biochimique API20 E.....	33
Tableau 03 : Température de croissance testée.....	34
Tableau 04 : pH de croissance testée.....	35

Liste des abréviations

YMB: Yeast Mannitol Broth.

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMA+ RC: Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo

YMA+ BTB: Yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol.

GPA+ BCP : Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol.

Lotus corniculatus L. : L = Linné

Introduction

Les légumineuses sauvages jouent un rôle crucial dans les écosystèmes en favorisant la fixation biologique de l'azote grâce à leur interaction symbiotique avec diverses bactéries. Cette association symbiotique est essentielle pour les plantes légumineuses, car elle leur permet d'obtenir de l'azote sous une forme assimilable. De plus, les bactéries bénéficient de cette relation en accédant aux nutriments nécessaires à leur développement.

La famille des légumineuses, qui inclut notamment les genres *Hippocrepis* et *Lotus*, joue un rôle crucial en tant qu'hôte dans les associations symbiotiques. Ces genres, considérés comme des légumineuses sauvages, sont principalement présents dans la région du bassin méditerranéen, où l'on trouve la tribu des Loteae (Kramina et Sokoloff, 2004). On les rencontre également dans d'autres régions d'Europe, d'Asie et d'Afrique.

En Algérie, les genres *Lotus* et *Hippocrepis* sont largement répartis en fonction des conditions climatiques. Selon Quezel et Santa (1962) et Ozenda (1983, 2004), le genre *Lotus* comprend principalement 26 taxons, localisés essentiellement sur la côte et les hauts plateaux du pays. Ces taxons se trouvent dans une gamme de climats allant du semi-aride à l'humide, avec une variation climatique plus marquée d'ouest en est.

De la même manière, le genre *Hippocrepis*, qui compte environ 40 espèces, présente une répartition géographique variée dans les régions sub-humides, humides, semi-arides et arides du pays, comme le démontrent les études de Djouadi et al. (2021). Ces deux genres témoignent clairement de la diversité et de la richesse des légumineuses en Algérie, qui sont adaptées à une variété de climats et d'habitats.

Les rhizobia, qui constituent le deuxième élément de l'association symbiotique avec les légumineuses, sont des bactéries présentes dans le sol capable de fixer l'azote atmosphérique en formant des nodosités sur les racines des plantes hôtes. Cette relation mutuellement bénéfique permet à la plante de fournir une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries, qui, en retour, produisent de l'ammoniac pour leur hôte.

Traditionnellement, les nodules racinaires des légumineuses étaient exclusivement colonisés par des Alpha-Proteobacteria. Cependant, des découvertes récentes ont élargi notre compréhension de cette symbiose. Moulin et al. (2001) ont identifié deux souches de Beta

Proteobacteria capables de noduler des légumineuses des genres *Burkholderia* et *Ralstonia* (Chen et al., 2001). De plus, Benhizia et al. (2004) ont mentionné la présence de souches de Gamma-Proteobacteria chez les légumineuses du genre *Hedysarum*. Ces découvertes révèlent une diversité accrue des bactéries symbiotiques capables de former des nodules sur les racines des légumineuses, illustrant ainsi la complexité et l'adaptabilité de ces interactions symbiotiques.

Selon Sebbane (2007), il existe peu d'études sur la diversité des bactéries qui nodulent les légumineuses en Algérie. Cette recherche se concentre donc sur l'isolement et la description phénotypique des bactéries obtenues à partir des nodules racinaires des genres *Hippocrepis* et *Lotus*. Pour atteindre l'objectif fixé pour cette étude, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Étude morphologique et microscopique.
- Caractérisation phénotypique des isolats à l'aide d'une série de tests.

Chapitre I

Étude bibliographique

I.1. Description des relations Sol-Plante-Microorganismes

I.1.1. Rhizosphère

Le terme "rhizosphère" a été proposé par Lorenz Hiltner en 1904 pour décrire la zone du sol influencée par les racines des légumineuses. Depuis, sa définition s'est élargie pour englober l'ensemble des interactions entre le sol, les plantes et les micro-organismes dans cette zone unique (Hiltner, 1904).

La rhizosphère est un micro-habitat aux limites floues. Elle s'étend de la surface de la racine, où les modifications microbiennes sont les plus prononcées, jusqu'à une distance variable (environ 1 à 5 mm) où l'influence de la racine s'estompe. Cette zone dynamique est caractérisée par des propriétés physico-chimiques et biologiques distinctes du reste du sol (Rovira et Davey, 1971).

I.1.2. Organismes de la rhizosphère

I.1.2.1. Plantes et la rhizosphère

Le premier processus qui intervient dans la rhizosphère est commandé par les racines des plantes. Elles opèrent des changements qualitatifs du sol qui les entoure, de deux manières :

1. Modifications physiques :

Croissance des racines : La croissance des racines modifie la structure du sol en créant des pores et des canaux. Cela améliore la circulation de l'air et de l'eau dans le sol.

Exsudation racinaire : Les racines exsudent des substances organiques, telles que des sucres, des acides aminés et des enzymes. Ces substances modifient les propriétés physico-chimiques du sol, telles que le pH, le potentiel redox et la teneur en nutriments.

2. Modifications chimiques :

Il est essentiel de prendre en compte des facteurs cruciaux tels que le pH, le potentiel redox, la température, l'aération, l'humidité et la salinité.

Conséquences des modifications du sol :

Propriétés biologiques : Les modifications physico-chimiques du sol induites par les racines affectent la composition et l'activité de la microflore du sol.

Propriétés microbiologiques : La rhizosphère est une zone du sol qui est particulièrement riche en microorganismes. Les microorganismes de la rhizosphère sont responsables de nombreux processus importants, tels que la décomposition de la matière organique, la minéralisation des nutriments et la symbiose avec les plantes (Darrah, 1991).

I.1.2.2. Microorganismes et rhizosphère

Les microorganismes de la rhizosphère influencent la nutrition des plantes en améliorant la disponibilité des nutriments, la croissance racinaire et le processus de prélèvement des nutriments. Leur interaction bénéfique avec les racines favorise la santé des plantes en solubilisant des minéraux, fixant l'azote et réduisant les maladies du sol. Ces interactions sont essentielles pour une nutrition optimale et une santé du sol. Les racines des plantes nourries par des amis microscopiques du sol ! Ils débloquent les nutriments, fixent l'azote et boostent la croissance racinaire. Un travail d'équipe pour une terre et des plantes en santé (Hoflich et al., 1994 ; Patten et Glick, 1996).

Les microorganismes de la rhizosphère, qu'ils soient libres ou associés aux racines, jouent un rôle crucial dans la nutrition des plantes en modifiant la disponibilité des éléments minéraux. Certains microorganismes, tels que les bactéries fixatrices d'azote et les champignons mycorhiziens, favorisent la croissance des plantes en solubilisant des nutriments et en libérant des substances de croissance (Claude et Christelle, 2018). Ces interactions sont essentielles pour la santé des plantes et la biodisponibilité des nutriments dans le sol (Marie, 2018).

Les microorganismes, tels que les bactéries et les champignons, peuvent produire des substances acides ou complexâtes qui entraînent la dissolution des minéraux, avec des actions chimio-lithotrophes ou chimio-organotrophes.

Ils contribuent à la mobilité des éléments métalliques en traces en modifiant la disponibilité des nutriments et en altérant les minéraux.

Ces microorganismes peuvent également modifier la mobilité des métaux lourds en contrôlant la capacité de certains métaux à se lier aux sels organiques (Deneux-Mustin et al., 2001).

I.2. La Symbiose

I.2.1. Généralités

La symbiose rhizobium-légumineuse : Un enrichissement naturel du sol en azote. Les légumineuses hébergent des bactéries rhizobium dans des nodules racinaires. Cette association (découverte en 1889) est bénéfique pour les deux partenaires : La légumineuse profite de l'azote atmosphérique fixé par les bactéries, élément crucial pour sa croissance et habituellement apporté par des engrais chimiques polluants (Frank, 1889). La bactérie rhizobium reçoit des sucres de la légumineuse pour son développement.

L'azote fixé par la symbiose est ensuite restitué au sol via la décomposition des parties de la plante et des déjections animales ayant brouté les légumineuses.

Ce processus permet donc de : Réduire l'utilisation d'engrais azotés et leur impact environnemental. Enrichir naturellement le sol en azote pour les cultures futures (Ndiaye, 1996).

I.2.2. Spécificité de la symbiose rhizobia-légumineuse

La relation symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses est hautement spécialisée : un rhizobium particulier peut seulement établir une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse si celle-ci appartient à son spectre d'hôte, et réciproquement. Les plages de spécificité des spectres des légumineuses et des rhizobia varient considérablement. Certaines associations sont très spécifiques pour le partenaire bactérien, comme c'est le cas avec *Azorhizobium caulinodans* qui s'associe exclusivement avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988), alors que cette même légumineuse peut former des associations avec d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*) (Boivin et al., 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti*, qui forme des associations avec les espèces des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (De Lajudie et al., 1994).

I.2.3. Partenaire végétal

Les légumineuses, également connues sous le nom de *Fabaceae*, constituent, une des familles de plantes les plus importantes sur le plan économique et écologique. Elles comprennent une vaste gamme de plantes.

I.2.3.1. Famille des Fabacées

Les Fabacées (*Fabaceae*), également appelées légumineuses, constituent une importante famille de plantes dicotylédones dialypétales, superovariées, pouvant être herbacées ou arborescentes, annuelles, bisannuelles ou pérennes (Judd et al., 2002 ; Marouf et Reynaud, 2007). Leurs fruits, connus sous le nom de gousses ou de légumes, leur valent l'appellation de légumineuses, le terme le plus répandu pour désigner cette famille (Wojciechowski et al., 2004). Les Fabacées sont des plus grands groupes de Spermaphytes, aux côtés des Orchidacées et des Astéracées, avec plus de 20 000 espèces présentes dans des régions allant des zones froides aux zones tropicales (Quezel et Santa, 1962 ; Gepts et al., 2005 ; Cronk et al., 2006). La famille se divise en trois sous-familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* (*Faboideae*) (Wink, 2013). Les Fabacées sont réparties sur l'ensemble du globe, chaque sous-famille ayant une distribution spécifique (Ndayishimiye, 2011).

I.2.4. Lotus

I.2.4.1. Caractères généraux du genre Lotus

Lotus est une plante vivace de la famille des *Fabaceae*, originaire d'Europe, d'Asie et d'Afrique septentrionale, caractérisée par son feuillage divisé en trois petites feuilles, ses fleurs jaunes, et sa valeur fourragère. Elle est utilisée dans les mélanges pour prairies riches en espèces et est une source de nourriture pour de nombreux insectes. (FAO, 2014 ; UC SAREP, 2006 ; Hannaway et al., 2004). (Figure 01).



Figure 01 : la légumineuse du genre *Lotus* (El Mridj. Constantine 2024).

Grâce à leur capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia, sont considérées comme des pionnières en raison de leur capacité à coloniser des environnements difficiles. Leur biomasse, riche en protéines, les rend précieuses sur le plan écologique et pour l'agriculture et l'élevage (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004).

De multiples recherches menées dans diverses régions du globe sur différentes espèces de *Lotus* ont confirmé que ces plantes légumineuses forment des nodosités en association avec divers groupes de rhizobia : *Mesorhizobium spp.*, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Ensifer spp.*, et *Phyllobacterium spp.* (Sánchez et al. 2014).

I.2.4.2. Répartition géographique

En Algérie, on trouve principalement 26 taxons du genre *Lotus*, présents en grande majorité sur la côte et les hauts plateaux du pays. Leur répartition est liée à une gamme de climats allant du semi-aride à l'humide, cette variation étant plus marquée d'ouest en est. (Quezel et Santa 1962 ; Ozenda 1983, 2004).

I.2.4.3. Classification systématique

Selon Linné (1753), la position systématique du genre *Lotus* est le suivant :

Règne : Plantae
 Sous-Règne : Viridaeplantae
 Classe : Equisetopsida
 Sous-Classe : Magnoliidae
 Ordre : Fabales
 Famille : Fabaceae
 Genre : *Lotus*
 Espèce: *Lotus corniculatus* L.

I.2.5. *Hippocrepis*

I.2.5.1. Caractères généraux de Genre *Hippocrepis*

Hippocrepis est un genre de légumineuse de petite taille, généralement mesurant entre 10 et 20 cm. Elle produit des fleurs jaunes, petites et pendantes, regroupées en grappes de 2 à 5 sur des pédoncules presque aussi longs que la feuille. Son port est caractérisé par une croissance couchée et étalée, souvent dans une seule direction. Leurs gousses sont segmentées en sections successives, chacune étant creusée sur le côté intérieur par des échancrures arrondies en forme de fer à cheval. Les graines, quant à elles, sont courbées en arc (Djouadi et al., 2021). Elle fleurit généralement entre avril et mai. Elle préfère les milieux secs, typiquement la garrigue dénudée. Au niveau écologique, elle favorise les tonsures annuelles basophiles et prospère dans des conditions aéroxérophiles et thermophiles méditerranéennes <https://www.plante-mediterraneenne.fr/genres/hippocrepis/> (Figure 02).



Figure 02 : La légumineuse du genre *Hippocrepis* (El Mridj.Constantine 2024)

I.2.5.2. Répartition géographique

On trouve principalement ce genre qui comprend environ 40 taxons dans les régions méditerranéennes, la région du bassin méditerranéen est l'un des centres de diversité pour la tribu des *Loteae* (Kramina et Sokoloff, 2004). Notamment en Provence, Languedoc-Roussillon, ainsi que dans d'autres parties de l'Europe, de l'Asie et de l'Afrique.

En Algérie, la répartition géographique du genre *Hippocrepis* varie considérablement entre les zones sub-humides, humides, semi-arides et arides du pays (Djouadi et al., 2021). Cette distribution géographique peut s'expliquer par les conditions environnementales (Ayyad et El-Ghareeb 1972 ; Chapman 1960, 1966).

I.2.5.3 Classification systématique

Selon Linné (1753), la position systématique du genre *Hippocrepis* est le suivant :

Règne : Plantae
Sous règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous-classe : Rosidae
Ordre : Fabales
Famille : Fabaceae
Genre : *Hippocrepis*

I.2.6. Partenaire bactérien

En 1888, Beijerinck a réalisé le premier isolement des rhizobiums, qu'il a identifiés comme des agents de fixation de l'azote. L'année suivante, en 1889, Franck a été le premier à suggérer le nom de *Rhizobium* pour les désigner.

I.2.6.1. Caractères généraux

Les rhizobiums sont identifiés comme des bactéries fixatrices d'azote, de type Gram négatif, aérobies, qui se trouvent généralement dans le sol de manière libre ou en association avec des légumineuses. Ils font partie de la sous-classe alpha-protéobactéries, qui est elle-même une division de la vaste classe des eubactéries (Maidak et al., 1994). Comparativement à d'autres bactéries du sol, les rhizobiums et les Bradyrhizobiums ont des besoins élevés en Ca^{2+} , Fe^{2+} et Co^{2+} , et leurs exigences en vitamines varient considérablement. En général, le genre *Bradyrhizobium* est activé par la biotine, tandis que le *Rhizobium* requiert à la fois de la thiamine et du pantothénate (Werner, 1992). Ces bactéries sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire, ou à l'aide de 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992).

I.2.6.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Les Rhizobiums sont principalement des chimioorganotrophes aérobies, et leur culture est relativement facile. Ils prospèrent en présence d'oxygène et se nourrissent de glucides ainsi que de composés aminés relativement simples. Bien que certaines souches puissent fixer de l'azote en forme libre, cela reste rare et ne se produit que dans des conditions spécifiques. Certaines souches de *Rhizobium* nécessitent des vitamines pour leur croissance (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les Rhizobiums perdent rapidement leur capacité à survivre dans l'eau. Leur croissance optimale se situe à une température de 28 °C et à un pH compris entre 6 et 7. Bien que leur métabolisme soit généralement aérobie, plusieurs souches peuvent se développer efficacement dans des conditions microaérophiles, à des tensions d'oxygène inférieures à 0,01 atm (Somasegaran et Hoben, 1994).

I.2.6.3. Caractères génétiques

Selon Pelmont (1995), la génétique de *Rhizobium* présente des difficultés en raison du nombre élevé de gènes impliqués dans la symbiose et des diverses spécificités d'une souche à l'autre. Les caractéristiques génétiques des souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses les rendent particulièrement sensibles (Patricia et al., 1998 ; Raposeiras et al., 2002). Le génome du *Rhizobium* présente un intérêt particulier, avec trois types de réplicons pour un chromosome de plus de 4 Mb, un méga plasmide (1-2 Mb) et un plasmide de moins de 1 Mb, en fonction des espèces (Larango et al., 2002).

I.2.7. Nodulation

I.2.7.1. Nodule

Le nodule est une structure nouvellement formée par la plante hôte, dans laquelle les bactéries, transformées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique. Pour optimiser l'activité de la nitrogénase, une enzyme qui est irréversiblement inactive en présence d'oxygène, la plante maintient les nodules dans des conditions de faible teneur en oxygène grâce au parenchyme nodulaire. Parallèlement, la léghémoglobine régule et stabilise la concentration d'oxygène essentielle à la respiration. Selon Fernandez-López 1998, les nodules sont principalement racinaires, mais ils peuvent également être caulinaires. Tous les plants avaient en effet sur leur

système racinaire, notamment au niveau du collet, des nodosités de type spécifique, c'est-à-dire sphériques ou globuleux, appelées nodules des modioïdes par Corby (1981, 1988). (Figure 03).

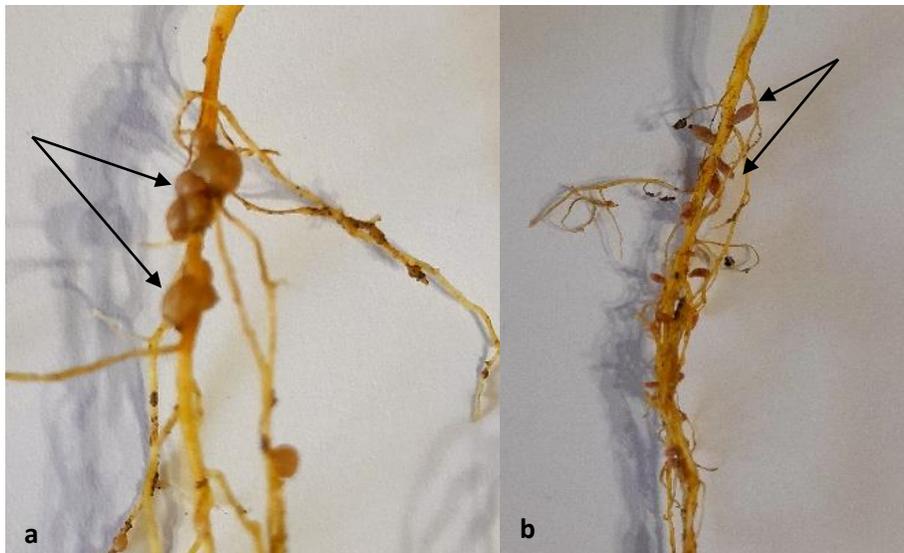


Figure 03 : Forme des nodules : (a) Nodules de *Lotus*. (b) Nodules d' *Hippocrepis*.

I.2.7.2. Processus de nodulation

La formation des nodules et la fixation de l'azote résultent d'une série d'interactions régulées par des signaux moléculaires entre la plante et les bactéries symbiotiques, marquant l'établissement de leur association symbiotique. De nos jours, on connaît parfaitement l'organogénèse des nodosités, depuis leur infection jusqu'à leur développement (Madigan et al., 2007). Les étapes sont les suivantes :

-Pré-infection

Selon Sprent (2001), cette étape se caractérise par une prolifération massive des Rhizobia dans la rhizosphère, qui commence par la colonisation des jeunes poils absorbants par ces bactéries. Ensuite, il y a un échange de molécules signales, dont les principaux médiateurs sont les flavonoïdes et les facteurs Nod. L'expression des gènes de la nodulation est induite par la protéine NodD des Rhizobia en réponse aux signaux flavonoïdes excités par la racine de la plante hôte (Bergen et al., 2001), et la déformation des poils absorbants se traduit par leur courbure, ce qui crée une configuration appelée "crosse de berger", favorisant ainsi l'adhérence des Rhizobia à la surface des racines. Des lectines spécifiques, des glycoprotéines d'origine végétale, favorisent

cette adhésion, ces lectines s'associaient de manière sélective aux polysaccharides de la paroi bactérienne (Selami,2017). (Figure 04).

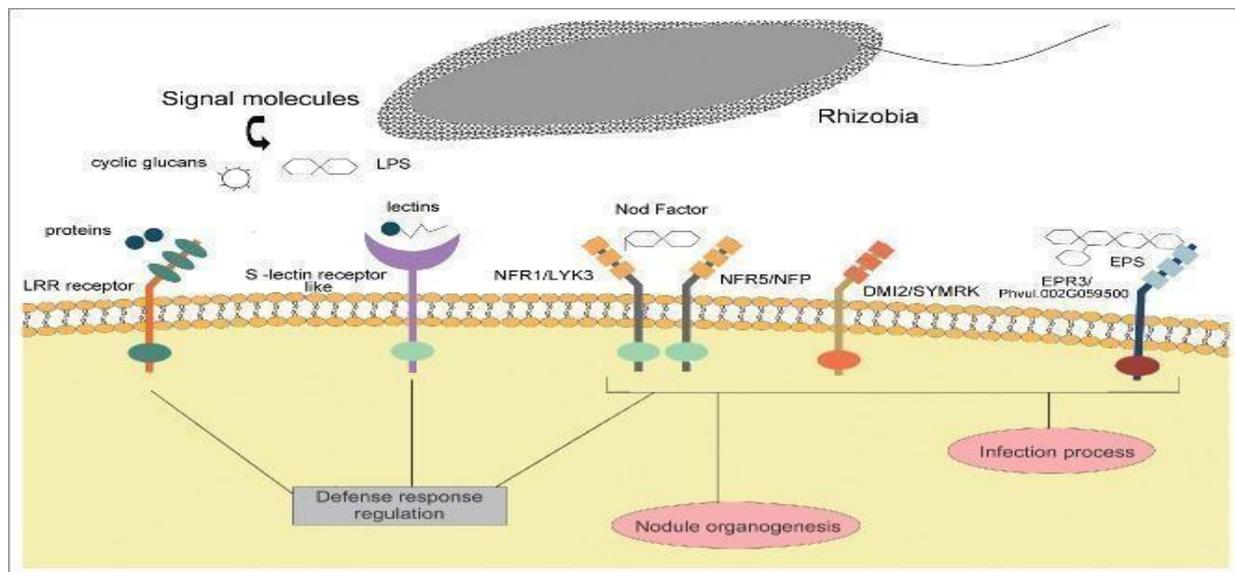


Figure 04 : La perception et la transmission du signal bactérien pendant la symbiose (Dalla et al. 2015).

-Infection du système racinaire

A partir de la courbure en crosse de berger, les Rhizobia pénètrent la cellule végétale par la formation d'une structure tubulaire appelée cordon d'infection. Ces cordons atteignent le cortex interne de la racine en créant des ramifications qui garantissent une colonisation efficace du nodule (Selami, 2017). C'est grâce à une fragilisation localisée de la paroi des poils sous l'action d'enzymes hydrolytiques que cette pénétration est facilitée (Viprey et al. 2000). (Figure 05) illustre la formation de celle-ci ainsi que sa progression dans les tissus internes de la racine.

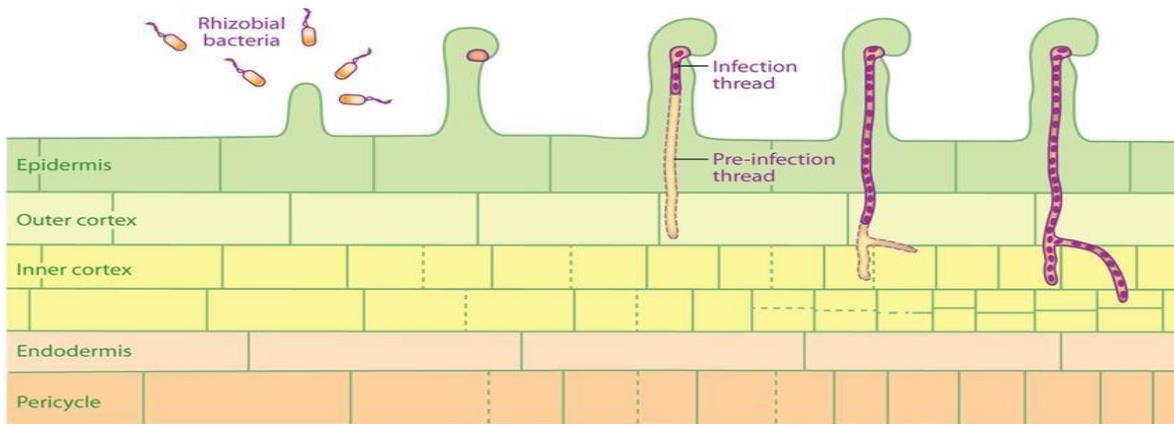


Figure 05 : Formation du cordon d'infection et sa progression (Oldroyd et al. 2010).

Dans les cellules racinaires, les cordons libèrent les Rhizobium, qui prennent une forme en Grass typique, pendant leur évolution (Figure 06). Selon Selami (2017), c'est à ce stade que les symbiosomes produisent la nitrogénase.

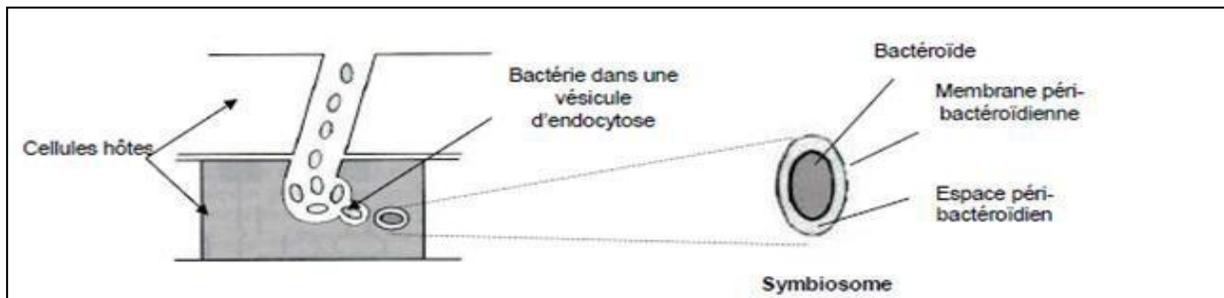


Figure 06 : Formation des symbiosomes et libération des bactéries (Selami, 2017).

-Nodulation proprement dit (Organogénèse du nodule)

L'ample multiplication et la différenciation des cellules du cortex racinaire se manifestent par une expansion des tissus nodulaires, conduisant à l'apparition du nodule à la surface de la racine. Les principales phases de formation des nodosités sont exposées ci-dessous et illustrées (Figure 07).

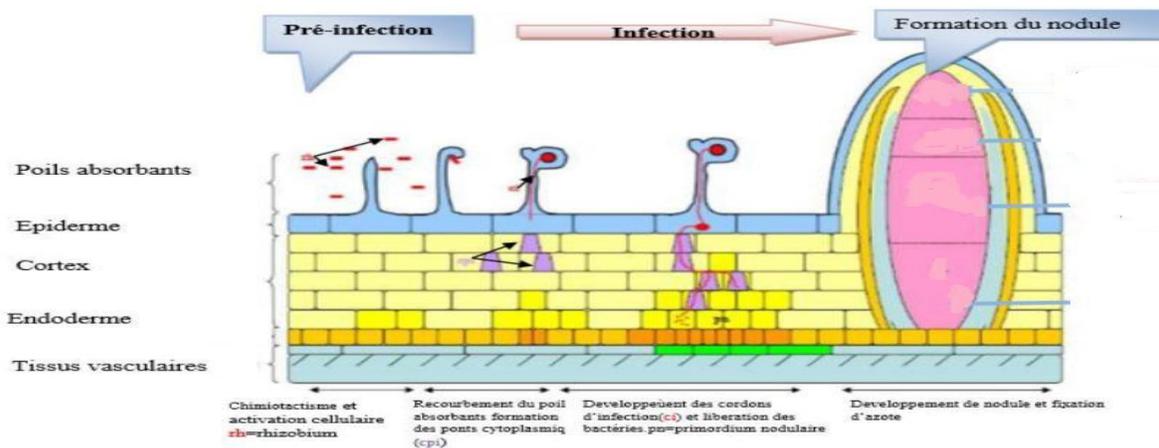


Figure 07 : Processus d'infection de la racine et mise en place du nodule chez *Medicago truncatula* (Selami, 2017).

- Réduction et assimilation de l'azote

Pendant cette phase, les nodosités produisent une molécule similaire à la léghémoglobine, qui présente une couleur brun-rouge. La léghémoglobine joue un rôle essentiel dans le transport et la régulation de l'oxygène vers les bactéroïdes (Hamida, 2003). Cela offre à la nitrogénase une niche de protection (Ott et al., 2005). De cette manière, la symbiose s'établit, permettant aux rhizobiums présents dans les nodules racinaires des légumineuses de fixer une quantité significative d'azote atmosphérique.

I.3. Cycle de l'azote

L'azote total est généralement réparti en trois principaux ensembles : l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée), et l'azote présent dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces ensembles sont désignés sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins, 2003).

I.3.1. Fixation biologique de l'azote

Naturellement, à l'état libre, les Rhizobium sont des bactéries souvent flagellées mobiles, mais en présence de légumineuses, elles perdent leur mobilité et sont autotrophes à l'azote (capables d'assimiler le N_2) tout en restant hétérotrophes au carbone (incapables d'assimiler le carbone minéral). La machinerie biochimique appropriée n'est pas disponible chez les organismes eucaryotes, ce qui les empêche de dégrader l'azote. Uniquement les procaryotes sont responsables de la fixation biologique de l'azote, car ils possèdent un complexe enzymatique appelé

médinitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkin, 2003). Il existe quelques bactéries fixatrices d'azote qui sont libres et ne nécessitent pas d'hôte pour accomplir cette action. D'autres fixateurs d'azote sont en revanche symbiotiques et ne fixent l'azote qu'en interaction avec certaines plantes (Madigan et al., 2007). La fixation de l'azote est presque la seule façon de préserver la fertilité du sol (Roger et al., 1996).

I.3.1.1. Les fixateurs libres

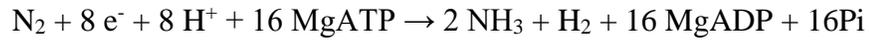
La plupart des bactéries libres qui fixent de l'azote sont capables de le fixer en laboratoire en grandes quantités. Cependant, dans le sol, la diminution de l'azote en ammoniac est restreinte par la disponibilité des glucides (Tortora et al., 2003). Ces bactéries jouent cependant un rôle important dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique (Tortora et al., 2003).

I.3.1.2. Les fixateurs symbiotiques

Chaque année, 120 millions de tonnes d'azote sont introduites dans les cycles biologiques grâce à la fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques, ce qui représente plus du double de l'apport réalisé par les bactéries libres (Davet, 1996). Ces bactéries ont un impact significatif sur la croissance des plantes agricoles (Tortora et al., 2003). Selon Dénarié (2000), la symbiose la plus cruciale d'un point de vue écologique et agronomique est celle qui lie les bactéries du sol, les *Rhizobium*, aux légumineuses. Les associations symbiotiques les plus courantes entraînent la formation de structures multicellulaires hypertrophiées sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, appelées nodules (Hopkins, 2003). Il est bénéfique pour les plantes concernées, qui utilisent les produits de fixation bactérienne de l'azote. La plante hôte offre aux bactéroïdes des composés carbonés, de l'énergie et les mécanismes de protection requis (Richter, 1993).

I.3.1.3. Mécanisme moléculaire de la fixation

Le processus de fixation de l'azote consiste à convertir l'azote moléculaire N_2 en ammoniac NH_3 (ou NH_4^+). Ce mécanisme de fixation du N_2 est endergonique et nécessite l'utilisation d'ATP ainsi que d'agents réducteurs qui fournissent les électrons et les ions H^+ requis. Contrairement aux fixateurs libres, les *Rhizobiums* ne peuvent fixer qu'à l'intérieur des nodosités, en fonction de la réaction :



La réaction de fixation est extrêmement onéreuse sur le plan énergétique (ATP et capacité de réduction) ; il faut 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule de N_2 (Shanmugan et al. 1978). C'est pourquoi l'activité de fixation est également influencée par le partenaire végétal. (Figure 08).

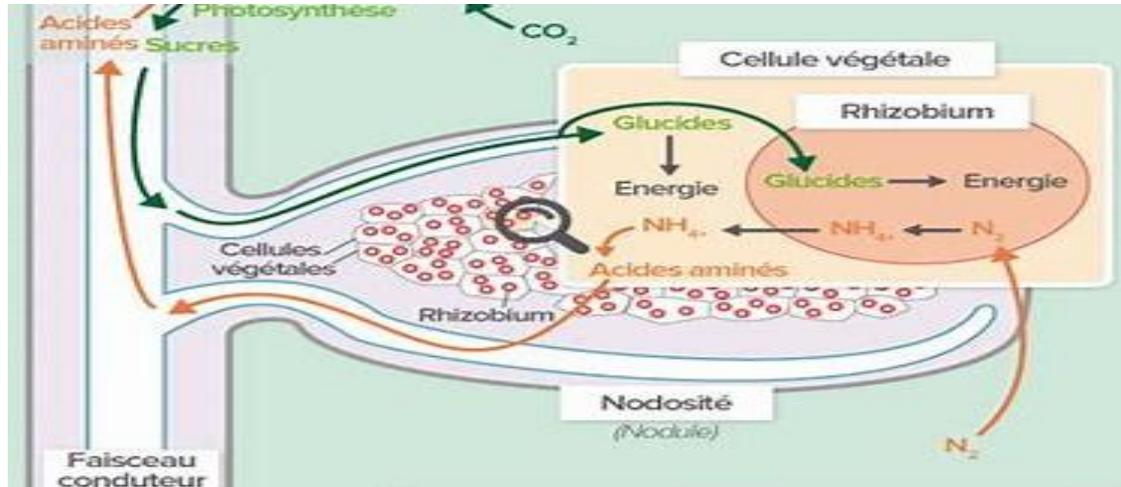


Figure 08 : Schéma simplifié du mécanisme de fixation symbiotique de N_2 (Benaissa,2022)

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Présentation de la zone de prélèvement

II.1.1. Situation géographique

La ville de Constantine est située dans le nord-est de l'Algérie (Latitude : $36^{\circ} 21' N$, Longitude : $6^{\circ} 36' E$). Elle se trouve à environ 320 kilomètres à l'est de la capitale Alger, à 90 kilomètres au sud de la mer Méditerranée, et à proximité des villes de Sétif à l'ouest (120 km) et Annaba à l'est (150 km). Constantine est caractérisée par un relief accidenté, étant perchée sur un plateau rocheux à une altitude d'environ 640 mètres au-dessus du niveau de la mer (Figure 09). Le climat de Constantine est de type méditerranéen avec des étés chauds et secs et des hivers doux et humides. La précipitation annuelle moyenne est d'environ 700 mm.



Figure 09 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.

II.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

II.2.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines des deux plantes *Lotus* et *Hippocrepis* dans la zone de Constantine. La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars et Avril quand la terre reste sec, à cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines (Figure 10).



Figure 10 : Collecte des nodules.

La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Beck et al., (1993). Une creusée d'environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire ; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains ; couper les racines et les mettre dans des sacs en plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachés à 1 à 2mm du site d'attache, enfin séchées avec du papier absorbant avant leur conservation.

II.2.2. Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace). Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du CaCl₂ (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules (Figure 11).

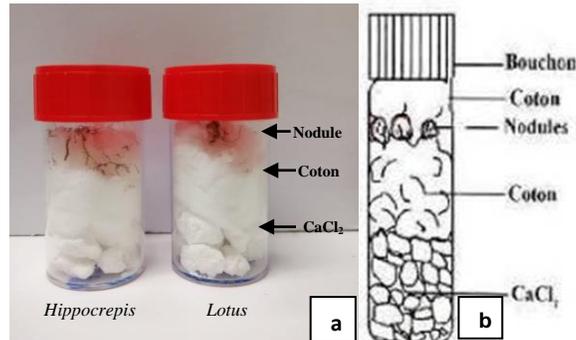


Figure 11 : (a) Tubes utilisés pour la conservation des nodules dans notre étude.
(b) Conservation des nodules (Vincent, 1970).

II.2.3. Isolement des souches à partir des nodules

La technique d'isolement des bactéries est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1985, 1994). Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles qui sont conservées par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis pendant 1h à la température ambiante.

II.2.4. Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans le Chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g HgCl₂ + 5ml HCl + 1L d'eau distillée) pendant 3 minutes. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans de l'eau distillée stérile et laisser gonfler après le 10^{ème} rinçage.

II.2.4.1. Test de stérilisation

Prendre un nodule stérile et le faire ensemencer dans le milieu GPA+BCP, puis le placer à 28°C pendant 24 heures. Toute cette manipulation doit être effectuée sous des conditions microbiologiquement contrôlées, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen, sous une hotte à flux laminaire. Afin de vérifier la méthode de stérilisation utilisée et la stérilité externe des nodules.

II.2.4.2. Ecrasement des nodules

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile. Puis déposées chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.

II.2.5. Isolement des souches

Suite à l'écrasement et à la formation d'un jus trouble. En utilisant une anse de platine, on prélève la suspension de nodules en utilisant la méthode des trois cadrans. Sur gélose coulée en boîte (YMA, YMA+RC et GPA), puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 heures (Figure 12).

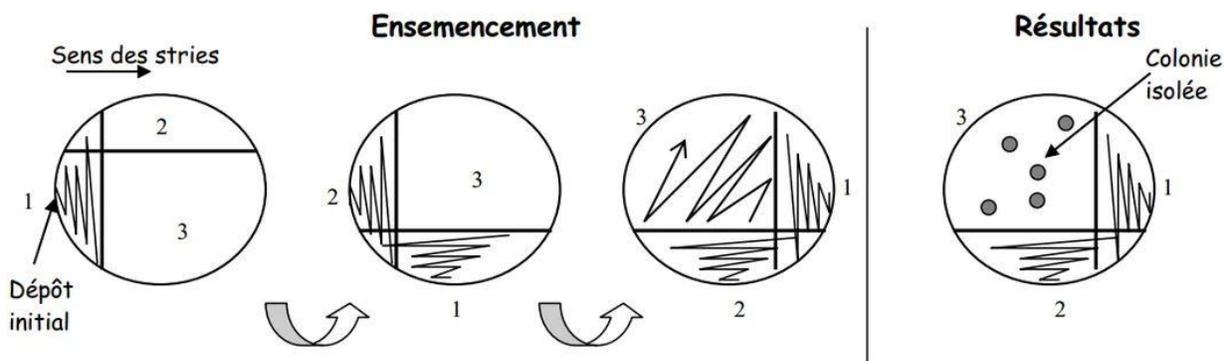


Figure 12 : Isolement par la méthode des trois quadrants.

II.3. Caractères morphologiques et cultureux

II.3.1. 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. 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 (compositions en annexe) :

- Milieu liquid: YMB (yeast Mannitol Broth).
- Milieu solid: YMA (yeast Mannitol Agar).
- YMA+RC (yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)
- YMA+BTB (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).

-GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol).

II.3.2. Purification des isolats

Après l'examen des isolats selon les caractères microscopiques et morphologiques sur les différents milieux (Vincent, 1970., Somasegaram et Hoben, 1994), des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification. La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis les placer dans un bain Marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C. Après 24h d'incubation, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Enfin, des examens microscopiques et morphologiques sont effectués.

II.3.3. Examen microscopique

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupes Gram positif et Gram négatif (Tortora., 2003).

- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant basique le violet de Gentiane.
- Laisser agir pendant 1 minute.
- Chasser le violet avec le Lugol, ensuite recouvrir le frottis pendant 1 minute.
- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau courante.
- Recouvrir le frottis par la Fushine et laisser agir durant 1 minute.
- Laver à nouveau avec de l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant et enfin observer à microscope.

II.3.4. Examen de la mobilité

Par une pipette pasteur contenant une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incubé pendant 24h et observé.

II.3.5. Observations des colonies et conservation des isolats

Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sur milieu YMA et n'ayant pas acidifié le milieu GPA (virage du BCP au jaune) sont prises en considération. Une observation microscopique (coloration de Gram) et un examen morphologique des colonies sur milieu YMA sont réalisés sur les isolats avant d'être conservés sur YMA tamponné avec du CaCO₃ (3 g/l). Après une incubation de 24 heures, les souches sont stockées au réfrigérateur en vue de leur caractérisation.

II.4. Caractérisation phénotypique des isolats

Dans le premier cas, il s'agit de vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente sur le milieu YMA contenant le Bleu de Bromothymol, et de tester l'absorption du Rouge Congo sur milieu YMA par les isolats.

II.4.1. Test de bleu Bromothymol

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, ...). Pour cela on cultive nos isolats sur milieu YMA+Bleu de Bromothymol. L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).

II.5. Tests nutritionnels

II.5.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Ces tests ont été mis en œuvre sur milieu YMA où l'extrait de levure a été réduit à 0.05g/l et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Xylose, Galactose, Glucose, Lactose, Saccharose (Vincent., 1970). On ensemence les différents milieux et on incube à 28°C pendant une période de 24 à 48 heures environ.

II.6. Tests biochimiques

II.6.1. Réduction des nitrates

Les souches sont cultivées sur le bouillon TY contenant 0.1% de KNO_3 (p/v), et incubées pendant 4 jours à 28°C ; après incubation sont ajouté 3 à 4 gouttes des réactifs I et II. Après addition des réactifs I et II, s'il y a une coloration rouge, les souches ont une nitrate réductase+ ; si non, on rajouter de la poudre de zinc et on note la couleur (la couleur rouge signifie la non réduction des nitrate, alors qu'un milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche à la nitrate réductase).

II.6.2. Galerie biochimique API 20 E

Une suspension bactérienne est employée pour réhydrater chaque puits, et les bandelettes sont ensuite incubées. Au cours de cette incubation, les activités métaboliques des bactéries provoquent des modifications de couleur, qui se manifestent de manière spontanée ou sont révélées par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions (positives ou négatives) se fait en fonction des variations des couleurs.

II.6.3. Test de l'Oxydase

Pour cela, nous utilisons des pinces pour fixer un disque d'oxydase sur une lame porte-objet. Une colonie isolée et représentative de la culture fraîche a été sélectionnée pour être testée.

La colonie sélectionnée est prélevée à l'aide d'un bâtonnet ou d'une öse. Dans un délai de 30 secondes, on frotte délicatement la colonie sur le disque et on observe l'apparition d'une coloration violette.

II.7. Tests physiologiques

II.7.1. Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures : 4°C , 24°C , 28°C , 37°C .

II.7.2. Effet du pH

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). En présence d'un bon éclairage, comparer visuellement la turbidité de la suspension d'essai à celle de McFarland standard. Cela peut être facilité par l'utilisation d'une carte ou d'une balance Wickerham (1950) (Figure 13).

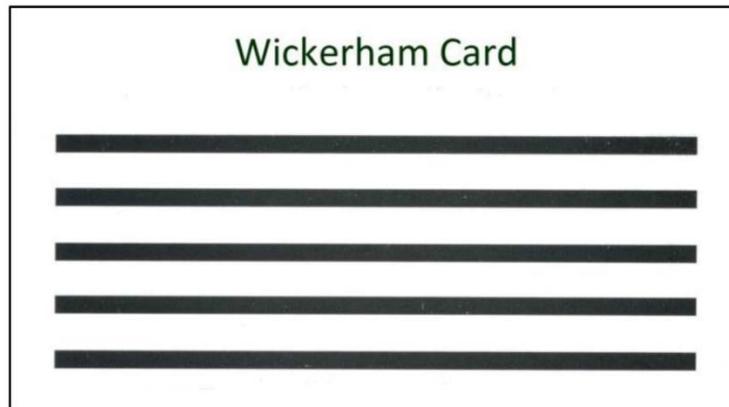


Figure 13 : Carte de turbidité de Wickerham (1950).

Chapitre III

Résultats et discussion

Introduction

On considère toujours que la caractérisation phénotypique traditionnelle est l'étape essentielle pour identifier et séparer les bactéries récemment isolées. Chez les rhizobiums, elle est le maillon fort de la description formelle. De plus, elle a été largement utilisée dans la séparation des espèces chez les bactéries endophytes associatives.

À côté de ces données dans l'analyse de la biodiversité et de la taxonomie, en particulier polyphasique, les caractéristiques phénotypiques permettent de choisir des souches compétentes et insensibles aux différents stress environnants.

Parmi le nombre total de nodules collectés sur les racines des genres *Hippocrepis* et *Lotus*, nous avons considéré 4 isolats : LOTN24/004, LOTN24/007, HIPN24/001, HIPN24/002.

III.1. Test de stérilisation

Après la stérilisation, l'analyse à l'œil nu des nodules sur le milieu GPA a confirmé l'absence de particules externes et de microorganismes indésirables, ce qui indique que la surface des nodules était correctement désinfectée. Il est démontré par ces résultats que la technique de stérilisation de surface utilisée dans cette étude est efficace (Figure 14).

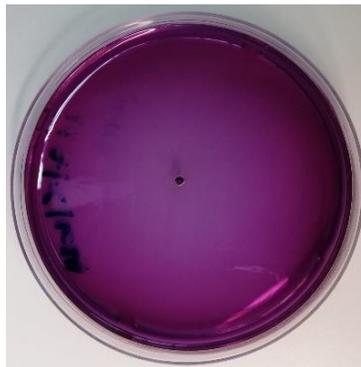


Figure 14 : Absence des microorganismes autour de nodule désinfecté

III.2. Caractères morphologiques et cultureux

III.2.1. Croissance sur YMA

Après 24 à 48 heures, on observe une croissance significative sur le milieu YMA. Les colonies sont blanchâtres ou crèmes, de diamètre compris entre 2 et 4 mm, rondes avec un

contour régulier, semi-bombées et lisses. Elles présentent une transparence, une visqueusité et une brillance, avec une texture uniforme (Figure 15).

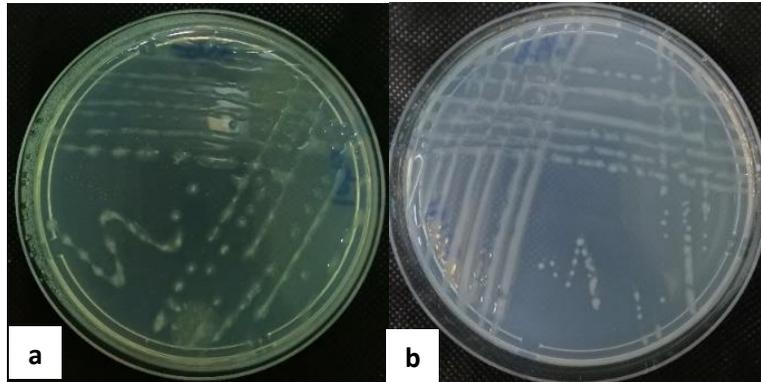


Figure 15 : Aspect des colonies sur YMA. (a) : genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus*

III.2.2. Croissance sur YMA+ RC

Les rhizobia génèrent généralement des colonies blanches ou absorbent peu le Rouge Congo. Bien qu'il soit fréquemment ajouté au milieu de culture afin d'isoler les rhizobia et de tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être utilisé comme un agent sélectif pour différencier les rhizobia des autres bactéries (in. Torche, 2006). Nos isolats sont incapables d'absorber le rouge de Congo, ce qui les rend blanches et rarement rose (Figure16).

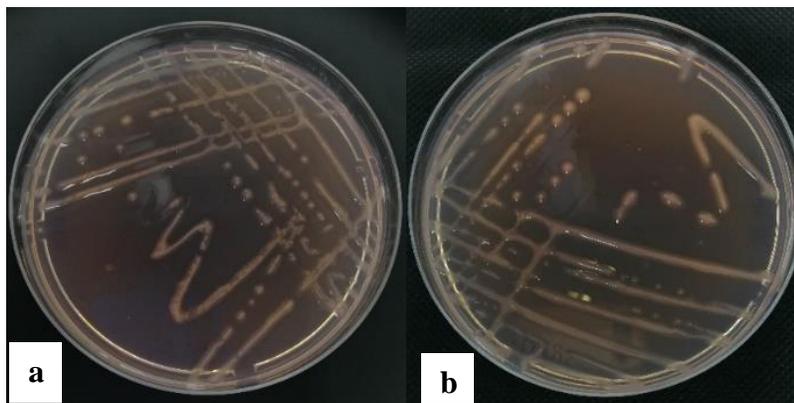


Figure 16 : Croissance sur milieu YMA+ RC (a) : genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus*

III.2.3. Croissance sur GPA+BCP

Lorsque les bactéries se développent sur le milieu GPA, elles acidifient et alcalinisent le milieu après 24 à 48 heures. Après 24 heures, nos bactéries se développent sans acidifier le milieu (Figure 17).

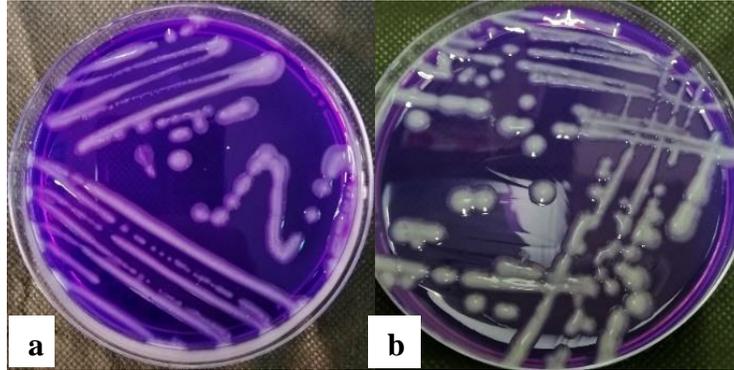


Figure 17 : Alcalinisation sur milieu GPA+BCP (a) : genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus*

III.2.4. Aspect microscopique

On peut observer des bâtonnets roses à Gram négatif qui correspondent à l'aspect microscopique des rhizobia grâce à l'observation microscopique.

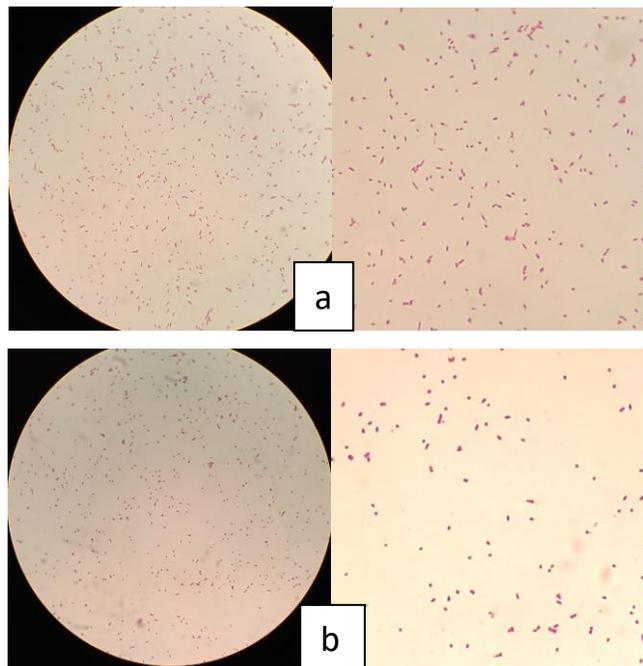


Figure 18 : Observation microscopique des bactéries isolées ($\times 100$)
(a) : genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus*

Toutes les données obtenues concernant l'aspect macroscopique et microscopique indiquent que les isolats présentent la même description des rhizobia.

III.2.5. Mobilité des souches

La présence des isolats dans le milieu Mannitol mobilité confirme également que les souches isolées sont mobiles avec une acidification du milieu (Figure 19).



Figure 19 : Résultat de Mannitol mobilité

III.3. Caractérisation phénotypique des isolats

III.3.1. Test de Bleu de Bromothymol

Le Bleu de Bromothymol est en réalité un indicateur coloré qui permet de détecter une réaction acide ou basique dans une gamme de pH allant de 6 à 7.6. Les souches à croissance rapide sont perçues comme des bactéries acidifiantes (les couleurs du BTB se transforment en jaune), tandis que les souches à croissance lente sont perçues comme des bactéries alcalinisantes qui changent de couleur vers le bleu (Jordan, 1984., Beck et al., 1993., Pagano, 2008).

Tous nos isolats ont provoqué une modification du pH sur le milieu YMA+BTB après 24 à 48 heures d'incubation, ce qui s'est produit grâce à une acidification complète du milieu dans les boîtes. Cela suggère que nos souches sont en pleine croissance (Figure 20).

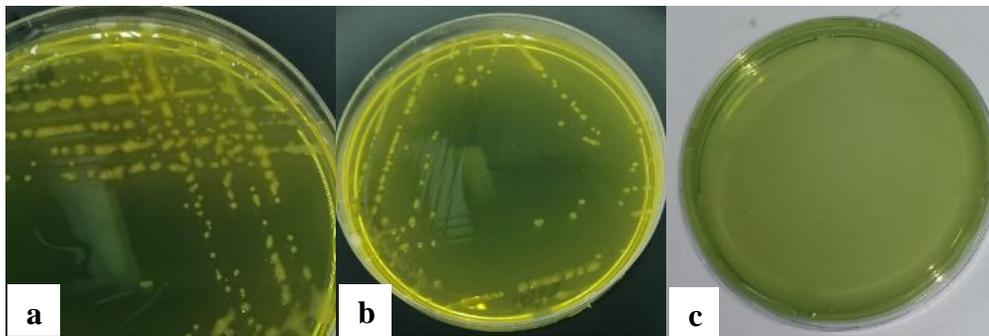


Figure 20 : Isolat à croissance rapide sur milieu YMA+BTB
(a) : genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus* (c) : Milieu YMA+BTB

III.3.2. Tests nutritionnels

III.3.2.1. Assimilation de la source de carbone

Selon les résultats obtenus, les souches utilisent tous les sucres testés comme source unique de carbone, mais elles diffèrent entre l'un et l'autre. Le Saccharose et le Galactose sont les deux sucres les plus facilement assimilés par toutes les souches. Alors que le Lactose, le Glucose et le Xylose sont les moins utilisés pour toutes souches. Cependant, la capacité des rhizobiums à absorber les diverses sources de carbone diffère (Allen et Allen, 1950) (Figure 21).

Dans le tableau 1, les résultats indiquent que les souches présentent une différenciation dans leur capacité à absorber les substrats carbonés.

Tableau 01 : Le groupe des souches testées utilise les sucres comme source de carbone.

	Saccharose	Lactose	Galactose	Glucose	Xylose
LOTN24/004	+++	+	+++	++	++
LOTN24/007	+++	+	+++	++	++
HIPN24/001	+++	+	+++	++	++
HIPN24/002	+++	+	+++	++	++

(+) : Croissance faible, (++) : croissance moyenne, (+++) : Croissance forte.

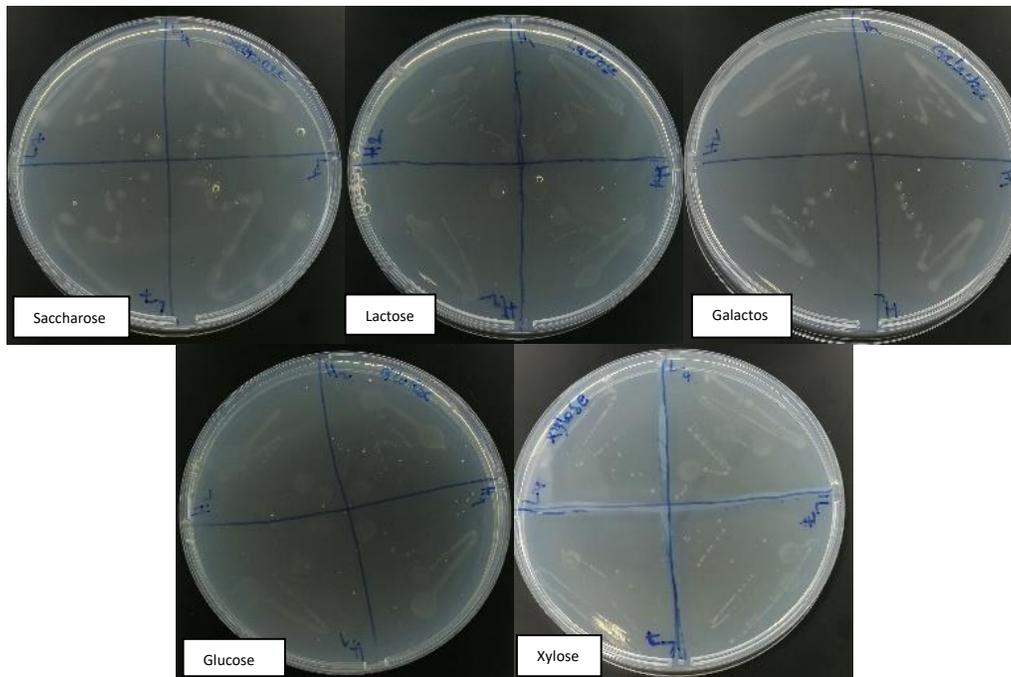


Figure 21 : Assimilation des sucres par les souches testées

III.3.3. Tests biochimiques

III.3.3.1. Réduction des nitrates

L'objectif de cette étude est de démontrer le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux. Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs nitrates I et II toutes les souches donnent une réaction positive après l'addition de la poudre de zinc (Figure 22).



Figure 22 : réduction de nitrate positif (+)

III.3.3.2. Galerie biochimique API 20 E

On a utilisé la galerie API20E pour identifier les caractéristiques des bactéries étudiées (Figure 23 et tableau 2).



Figure 23 : Galerie biochimique Api 20 E (a) : Genre *Lotus* (b) : Genre *Hippocrepis*

Tableau 02 : Galerie biochimique API20 E.

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Résultat+	Résultat -	Résultat+	Résultat -
			genre <i>Hippocrepis</i>		genre <i>Lotus</i>	
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	*		*	
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	*		*	
ODC	Ornithine	Ornithine- décarboxylase	*			*
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	*		*	
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S		*	*	
URE	Urée	Uréase		*		*
TDA	Tryptophane	Tryptophane –désaminase		*		*
IND	Tryptophane	Production d'indole		*		*
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	*			*
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase		*	*	
GLU	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	*			*
MAN	D-mannitol	fermentation - oxydation (MANnitol)	*		*	
INO	Inositol	fermentation - oxydation (INOsitol)		*	*	
SOR	D-sorbitol	ermentation - oxydation (SORbitol)	*		*	*
RHA	L-rhamnose	fermentation - oxydation (RHAmnose)	*		*	
SAC	D-saccharose	fermentation - oxydation (SACcharose)	*		*	
MEL	D-melibiose	fermentation - oxydation (MELibiose)	*		*	
AMY	Amygdaline	fermentation - oxydation (AMYgdaline)	*		*	
ARA	L-arabinose	fermentation - oxydation (ARAbinose)	*		*	

III.3.3.3. Test de l'Oxydase

Après 30 secondes, nous avons constaté l'absence de coloration violette ce qui indique l'absence de l'enzyme cytochrome oxydase (Figure 24).

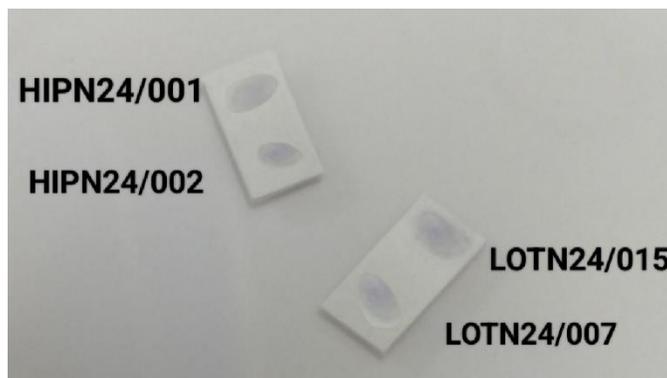


Figure 24 : Disque oxydase négatif (-)

III.3.4. Tests physiologiques

III.3.4.1. Effet de température

Toutes les souches peuvent évoluer à des températures allant de 4°C à 37°C, avec un taux de croissance optimal entre 24°C et 37°C, ce qui correspond à celui indiqué pour les rhizobia par Jordan (1984). Alors que les souches cultivées à une température de 4°C nécessitent 48 heures et plus pour se développer (Tableau 03, figure 25).

Tableau 03 : Température de croissance testée.

	4°C	24°C	28°C	37°C
LOTN24/004	+	+++	+++	++
LOTN24/007	+	+++	+++	++
HIPN24/001	+	+++	+++	++
HIPN24/002	+	+++	+++	++

(+) : Croissance faible, (++) : croissance moyenne, (+++) : Croissance forte.

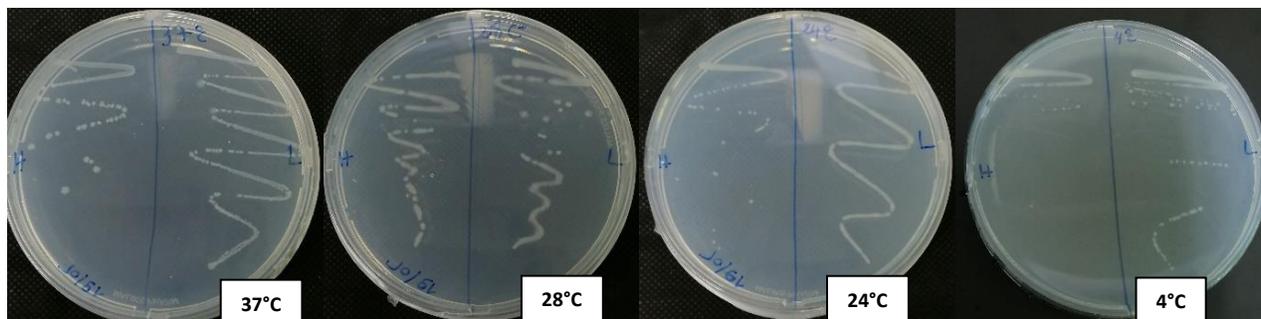


Figure 25: Effet de la température sur la croissance des souches

III.3.4.2. Effet du pH

On peut constater à partir du test de l'effet du pH sur la croissance et le développement des isolats que toutes les souches peuvent pousser entre pH 4 et pH 10 (Tableau 04), avec un optimum de croissance pour les souches testées se situant entre pH 6 et 7 (Figure 26).

D'après Fujihara et Yoneyama (1993), *Sinorhizobium fredii* se développe efficacement entre 4 et 9,5 pH, tandis que *Bradyrhizobium japonicum* ne peut pas pousser aux extrémités de cette plage de pH. Les mêmes résultats sont obtenus par Ali et al. (2009). Les mécanismes de survie des Rhizobiums dans les conditions acides du sol varient (Zahran, 1999).

La présence d'acidité dans le sol entrave la fixation symbiotique de l'azote en restreignant la survie du *Rhizobium* et sa persistance dans les sols, ainsi qu'en réduisant la nodulation (Appunu et Dhar, 2006).

Tableau 04 : pH de croissance testée

	04	05	06	07	08	09	10
LOTN24/004	+	+	+++	+++	++	+	+
LOTN24/007	+	+	+++	+++	++	+	+
HIPN24/001	+	+	+++	+++	++	+	+
HIPN24/002	+	+	+++	+++	++	+	+

(+) : Croissance faible, (++) : croissance moyenne, (+++) : Croissance forte.

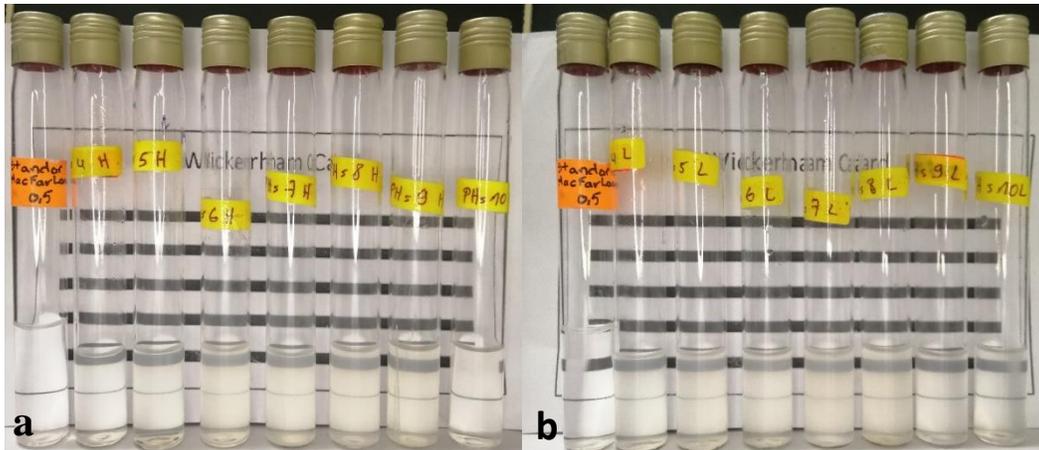


Figure 26 : Effet du pH sur la croissance de souches isolées
(a) : genre *Hippocrepis* (b) : genre *Lotus*

Conclusion

Dans cette étude, nous avons réalisé l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries nodulantes des légumineuses sauvages des genres *Lotus* et *Hippocrepis*, provenant du site d'El Merij, Constantine.

L'objectif de cette recherche est double : d'une part, identifier les différentes souches nodulantes des légumineuses sauvages des genres *Lotus* et *Hippocrepis*, en évaluant leurs caractéristiques et leur diversité ; d'autre part, déterminer la position taxonomique de ces isolats et évaluer l'influence des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, et la disponibilité des nutriments.

Nous avons réalisé notre étude sur deux genres de plantes légumineuses sauvages : *Hippocrepis* et *Lotus*. Pour chaque genre, nous avons examiné deux isolats : HIPN24/001, HIPN24/002, LOTN24/004, et LOTN24/007.

Les caractéristiques microscopiques et morphologiques des colonies des souches étudiées correspondent à la description fournie par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994), et Jordan (1984). Lors de notre étude microscopique, nous avons observé des bacilles de tailles variées à Gram négatif. La rapidité de croissance des isolats, obtenue en 24 heures sur le milieu YMA+BTB, confirme ces résultats, ce qui peut nous orienter vers le genre *Rhizobium*.

Selon les informations de la fiche API 20E de bioMérieux, la bactérie identifiée peut appartenir à la famille des *Enterobacteriaceae*, notamment *Enterobacter cloacae*. Des études antérieures ont souligné la présence de Gamma-Proteobacteria (Benhizia et al., 2004). Selon ces mêmes auteurs, les nodules de l'espèce *Hedysarum pallidum* contiennent une population mixte de deux types de bactéries très proches, dont les ADN 16S sont homologues à 99 % avec *Enterobacter cloacae* et à 98 % avec *Enterobacter kobei*.

Chez nos isolats, l'analyse biochimique met en évidence la présence de la nitrate réductase et l'absence de l'activité uréolytique, Cependant, l'activité pectinasique et cellulosique n'a pas été étudiée en raison du manque de réactifs spécifiques, ce qui empêche de conclure sur la présence ou l'absence de l'aspect infectif chez nos isolats.

Selon les résultats du test nutritionnel, il est observé que les isolats ont tendance à utiliser une gamme de carbohydrates comme source de carbone. Toutes les souches ont montré la capacité de se développer à des températures optimales, conformément aux conditions indiquées pour les rhizobia par Jordan (1984).

D'après le test de l'influence du pH sur la croissance et le développement des isolats, il est possible de constater que toutes les souches peuvent évoluer dans un intervalle de pH allant de 4 à 10. Selon Fujihara et Yoneyama (1993), *Sinorhizobium fredii* se développe à un pH 4 à 9,5, tandis que *Bradyrhizobium japonicum* ne peut pas s'étendre aux extrémités de cette plage de pH. Les résultats obtenus par Ali et ses collègues (2009) sont similaires.

Ces résultats nous permettent de reconnaître que nos isolats présentent un profil de bactéries nodulant les légumineuses (Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Benhizia et al., 2004), de rhizobia (Vincent, 1970, 1982) ou de Gamma-Proteobacteria (Benhizia et al., 2004). Cependant, nous n'avons pas pu identifier de différence significative confirmant que nos isolats appartiennent au genre *Rhizobium* ou aux Gamma-Proteobacteria en raison de l'absence d'analyses génotypiques et d'autres techniques moléculaires. L'application de ces méthodes avancées sera sans aucun doute essentielle pour résoudre cette question.

Références

- Abdelguerfi, A.** et Abdelguerfi-Laouar, M. 2004. Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. Cahiers Options Méditerranéennes, 62 : 29–41. Abderrahmane Mira. Béjaïa. Algérie.
- Alabouvette, C.,** & Cordier, C. 2018. Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes. Innovations Agronomiques 69, 61-70.
- Ali S. F.,** Rawat L. S., Meghvansi M. K. and Mahna S. K. 2009: Selection of stress tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry region of Rajasthan, India. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. Vol 4, N°1.
- Allen E. K.,** and Allen O.N., 1950. Biochemical and Physiological properties of the rhizobia.
- Ayyad, M.A.** et El-Ghareeb, R. 1972. Microvariations in edaphic factors and species distribution in a Mediterranean salt desert. Oikos, 23:125–131. doi:10.2307/3543933. Bacteriol. Rev. 14 pp 173-330.
- Beck D.P.,** Materon L.A., Afandi F., 1993. Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA, Syria.
- Beijerinck M.,** 1888. Die Bacterien der papilionaceenknollchen. Botanische Zeitung. 46:797-804.
- Benhizia Y.,** Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., 2004. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum. System. Appl. Microbiol. 27: 462 - 468.
- Bovin, C.,** Giraud, E., Malpia C, A and Rosenberg, C., 1997. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* pSymplasmid specifying catabolism of trigonelline, a second arymetabolite present in legumes. Journal of Bacteriology ,2 (9), pp2809 – 2817.
- Chapman, V.J.** 1960. Saltmarshes and salt deserts of the world. L. Hill Books Ltd., London. 392pp.
- Chapman, V.J.** 1966. Vegetation and salinity. Dans Monographiae Biologicae. Vol. 16. pp. 23–42.
- Chen W.M.,** Laevens S., Lee T.M., Coenye T., DeVos P., Mergeay M., Vandamme P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov. Isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 :1729 - 1735.
- Christensen, R. G.,** Eun, J. S., Yang, S. Y., Min, B. R., & MacAdam, J. W. 2017. In vitro effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) pasture on ruminal fermentation, microbial population, and methane production. The Professional Animal Scientist, 33(4), 451-460.
- Cronk Q.,** Ojeda I., Pennington R. 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Curr Opin Plant Biol (9) :99-103.
- Dalla VV.,** Narduzzi C., Aguilar OM., Zanetti ME., Blanco FA. 2015. Changes in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) transcriptome in response to secreted and surface signal molecules of *Rhizobium etli*. Plant Physiol.; 169:1356-70.

- Darrah, P. R.** 1991. The rhizosphere and plant nutrition. In *The rhizosphere* (pp. 153-172). Springer Netherlands.
- Davet P.** 1996 . Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris. France. pp 145-161.
- De Lajudie, P.,** Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., et Dreyfus, B. 1994. Inter and intraspecies genomic groupings of Bradyrhizobium strains nodulating African legume species (Papilionoideae and Mimosoideae). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 715-733.
- Denarie J.,** 2000 . Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- Deneux-Mustin, S.,** Lartiges, S. B., Villemin, G., Thomas, F., Yvon, J., Bersillon, J.L and Snidaro ,D. 2001. Ferricchloride and lime conditioning of activated sludges : an electronmicroscopic study on resin embedded samples. *Water research*, 35, PP 3018-3024.
- Djouadi S,** Bouherama A, Aïd F, Amrani S. 2021. Diversité des rhizobia associés au genre *Hippocrepis* en Algérie. *Botany.*;99(10):639-50.
- Djouadi S.,** Amrani S., Bouherama A., Noureddine NE, Aïd F. 2017. Nature des rhizobia associés à 15 espèces du genre *Lotus* en Algérie. *Botany.*;95(9) :879-88.
- Dreyfus B.,** Garcia, J.L and Gills, M. 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. sp. nov., a stem nodulation fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int.J. syst. Bacterial* ,38(1), pp 89-98.
- Frank B.** 1889. On the Fungus Symbiosis of Legumes. *Reports of the German Botanical Society*, 7, 331-340.
- Frank B.,** 1889. Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsc. Bot. Ges.* 7 pp 332-346.
- Fujihara S., Yoneyama T.** 1993. Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59, No. 4 pp 1104-1109.
- Fujihara S., Yoneyama T.** 1993. Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine
- Gepts P.,** Beavis W.D., Charles B., Nevin D., Norman F.W. 2005. Legumes as a Model Plant Family. *Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference*. *Plant Physiology* 137 (4): 1228-1235.
- Hamida S.** 2003. Étude de la symbiose entre rhizobium leguminosarum biovar trifolii et trifolium alexandrinum L (trèfle d'Alexandrie). Thèse de Magister en biologie publiée, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.; 16-20.

- Hiltner L.** 1904. New Experiences and Problems in the Field of Soil Bacteriology, with Special Consideration of Cultivation and Manure. Works of the Biological Section for Agriculture and Forestry at the Imperial Health Office, 3: 443-543.
- HIPPOCREPIS.** Plante Méditerranéenne –[en ligne]. (page consultée le 26/04/2024). <https://www.plante-mediterraneenne.fr/genres/hippocrepis/>
- Hoflich, G., W iehe, W., Kuhn, G.** 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganismes. *Experientia*, 50, pp897-905.
- Hopkins W.G.** 2003 . Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119.
- Jordan D.C.** 1984 . Rhizobiaceae. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed), *Bergey's Manual of*
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.** 2002. Botanique systématique.
- Kramina, T. et Sokoloff, D.** 2004. A taxonomic study of *Lotus australis* complex (Leguminosae), with special emphasis on plants from Pacific Ocean islands. *Adansonia*, 26(2): 171–197.
- Laranjo, M. C., Branco., Soares, L. Allo, M., Carvalho, Oliveira, S.** 2002 . Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (6), pp 10-43.
- Linné, C.** 1753. *Species Plantarum*. Stockholm: Laurentius Salvius. 744 p.
- Madigan ,M., Martink , J.** 2007. *Brock Biologie des microorganismes* 11e edition. Person Education France. pp 599 -60.
- Madigan M., Martink J.** 2007. *Brock Biologie des microorganismes* 11e edition. Edition Person Education France. pp 599-601, 676-681.
- Maidak, B. L., Larsen N., McCaughey M. J., Overbeek R., Olsen G. J., Foge K., Blandy J., and Woese C. R.** 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acid Res.* 22 pp 3485-3487.
- Marouf A. and Reyanaud J.** 2007. *La botanique de A à Z : 1662 définitions* Dunod. vol. 106, Paris.
- Moulin L., Munve A., Dreyfus B., Boivin-Masson C.** 2001. Nodulation of legumes by members of β sub class of proteobacteria. *Nature*. 441 :948 - 950.
- Ndayishimiye J.** 2011. Diversité endémisme géographie et conservation des Fabaceae. 12. Service d'Ecologie du Paysage, Ecole Inter facultaire de Bio ingénieurs, Bruxelles.
- Ndiaye, A.** 1996. *The Rhizobium-Legume Symbiosis: Biological Basis and Agronomical Applications.* Editions Quae.
- Oldroyd G, Murray J, Poole P, Downie J.** 2010. The Rules of Engagement in the Legume Rhizobial Symbiosis. *Annual review of genetics.*; 45: 119-44.

- Ott T**, Van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*.; 15 : 531–535.
- Ozenda, P.** 1983. Flore du Sahara. CNRS, Paris, France.
- Ozenda, P.** 2004. Flore et végétation du Sahara. CNRS, Paris, France.
- Pagano M.C.**, 2008. Rhizobia associated with neotropical tree *Centropogon tomentosus* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, 2008. 11: pp 498 – 508.
- Patricia, P.P.**, Raposeiras., R., Macedo., A.M., Seldin, L., Paiv, E., Nadm,H. 1998. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating rhizobium strains. *Revista de Microbiologie*.Print ISSN.
- Patten, C.L** and Glick B, R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, (42). Pp 207-220.
- Pelmont,j.**1995. Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2:pp 541 -572.
- Perez, A.** 2015. Bioaltération de verres basaltiques modèles : impact des sidérophores et rôle du fer (Doctoral dissertation, Université Paris-Est).
- Quézel P.**, and Sébastien S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 622. Centre national de la recherche scientifique, Paris.
- Raposeiras, R. P. P.**, Patrícia, V.M. P., Raul., S. Lucy., E. Paiva., M. R. Scotti., N. M. H.Sá. 2002.Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*. Print ISSN.pp1517 -8382.
- Richter G.**, 1993 . Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp 341-352.
- Roger P.**, 1996 . La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement ? Conférence de bat de l'ORSTOM. Paris Xe France.
- Rovira, A. D.**, et amp; Davey,C. B. 1971. Biology of the rhizosphere. *The rhizosphere*.
- Sánchez, M.**, Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Lorite, M.J., Sanjuán, J., Velázquez, E. et Monza, J. 2014. *Phyllobacterium lotisp. nov.* isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(3) : 781–786.
- Sebbane N.** 2007 . Contribution à la caractérisation phénotypique et génotypique de rhizobia
- Selami N.** 2007. Associations symbiotiques : Polycopié du cours destiné aux étudiants de deuxième année master en biotechnologie et génomique végétale.; 2-7.

- Shanmugan K T**, O'gara F, Andersen K., Valentine RC.1978. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Plant Physiol.; 263-276.
- Somasegaran P.**, Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Sringer verlage New York. Inc pp 450.
- Sprent JI.** 2001. Nodulation in legumes.Royal Botanic Gardens, Kew.; 221. Systematic Bacteriology. Vol 1. the Williams & Wilkins, Co., Baltimore. Systematics and Geography of Plants 72 (1):242-24. pp 234-245.
- Torche A.** 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre Hedysarum. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Tortora G.J.**, Funk B.R., Case C.L. 2003. Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. pp 826-830.
- Vincent J.M.**, 1970. The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.
- Viprey V**, Perret X, Broughton WJ.2000 Host-plant invasion by rhizobia. Subcell Biochem.;33:437-456.
- Werner,D.** 1992. Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany.Edition Chapman & Hall.
- Wink M.** 2013. Evolution of secondary métabolites in légumes (Fabaceae). South African Jornal of Botany. with soybean in low pH soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5(10) pp 842-845
- Wojciechowski M.F.**, Lavin M., Sanderson M.J. 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves man well-supported subclades within the family. American Journal of Botany 11 :1846-2004.
- Zahran H. H.**, 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Moleccular Biology Reviews, Vol. 63, N° 4 pp 968–989
- Zahran H. H.**, 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe
- Zakhia F.**, De Lajudie P. 2001. Taxonomy of rhizobia Agronomie. 21: 569 - 576.

Annexes

Milieux de culture et solutions utilisés

Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB	1000ml
Agar	20
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	20
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu YMA + Bleu de Bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5ml
Agar	20
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + Pourpre de Bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	20
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

Les solutions stocks colorants

- Solution stock de RC : 0.25g de Rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.
- Solution stock de BCP : 1g de BCP dissous dans 100ml d'éthanol.
- Solution stock de BTB : 0.5g de BTB dissous dans 100ml.

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BOUMAZA Lina MAOUCHE Lina
Caractérisation des bactéries nodulant le genre <i>Lotus</i> et <i>Hippocrepis</i> (légumineuse) poussant dans la région de Constantine	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne	
<p>Résumé</p> <p>Cette recherche a été menée sur quatre souches bactériennes prélevées à partir des nodules racinaires de deux plantes légumineuses sauvages, <i>Lotus</i> et <i>Hippocrepis</i>, répandues dans la région d'El Merij-Constantine. L'objectif était d'identifier les différentes souches qui nodulaient les deux légumineuses sauvages, ainsi que d'étudier leurs caractéristiques et leur diversité. L'analyse des souches s'est concentrée d'abord sur une analyse morphologique, permettant d'obtenir des colonies homogènes de forme circulaire, avec un contour régulier et une surface légèrement bombée. Ces bactéries se présentaient sous forme de bacilles à Gram négatif. Ensuite, une caractérisation phénotypique a été réalisée, incluant des tests nutritionnels, biochimiques et physiologiques. Bien que cette description demeure partielle, elle fournit des informations précieuses sur la position taxonomique hypothétique des isolats examinés dans cette étude.</p>	
Mots-clefs : <i>Lotus</i> , <i>Hippocrepis</i> , El Merij-Constantine, caractérisation, Gram, isolats.	
Laboratoires de recherche : laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (U Constantine 1 Frères Mentouri).	
<p>Président du jury : Dr. GUERGOURI Ibtissem (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri). Encadrant : Prof. BENHIZIA Yacine (PROF - U Constantine 1 Frères Mentouri). Examineur : Dr. CHABBI Rabah (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	

