



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 : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Caractérisation des BNL chez deux espèces du genre *Ononis* L.

---

Présenté par : GRINE Aya Noursaf

Le : 30/06/2025

KADRI Imene

KHOUDER Khadidja

Jury d'évaluation :

**Présidente :** Mme. Gaci Meriem (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Mr. Benhizia Yacine (Prof - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur :** Mr. Chabbi Rabah (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire  
2024 - 2025



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 : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Caractérisation des BNL chez deux espèces du genre *Ononis* L.

---

Présenté par : GRINE Aya Noursaf

Le : 30/ 06/ 2025

KADRI Imene

KHOUDER Khadidja

Jury d'évaluation :

**Présidente :** Mme. Gaci Meriem (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** Mr. Benhizia Yacine (Prof - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur :** Mr. Chabbi Rabah (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire  
2024 - 2025

## *Remerciements*

Nous remercions DIEU, le Tout-Puissant, de nous avoir donné la force et le courage d'accomplir ce travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadrant, le Professeur Benhizia Yacine, pour son accompagnement rigoureux, la pertinence de ses conseils et sa disponibilité infaillible, qui ont largement contribué à la réussite de ce travail.

Nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements à Monsieur Chabbi Rabah, maître-assistant à l'Université Constantine 1 Frères Mentouri, pour son soutien constant, ses encouragements bienveillants et ses remarques constructives, qui nous ont accompagnées tout au long de notre parcours.

Nous remercions sincèrement les membres du jury, en particulier Madame Gaci Meriem, maître de conférences à l'Université Constantine 1 Frères Mentouri, pour avoir accepté la présidence de ce jury, ainsi que Monsieur Chabbi Rabah pour avoir examiné et jugé ce travail.

Nous adressons une reconnaissance particulière à l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université Constantine 1 Frères Mentouri, pour leur précieuse collaboration et leur assistance technique.

Un grand merci à Madame Houda, ingénieure de laboratoire, pour son soutien technique, sa disponibilité et son aide généreuse.

Nous remercions également tous les enseignants qui nous ont formées durant notre parcours universitaire, pour la qualité de leur enseignement et leur engagement.

Nos remerciements vont aussi à toutes les personnes, de près ou de loin, ayant contribué à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous exprimons toute notre gratitude à nos familles pour leur amour inconditionnel, leur compréhension et leur soutien.

## Résumé

La famille des légumineuses joue un rôle fondamental dans l'amélioration de la fertilité des sols grâce à leur capacité à établir une symbiose avec des bactéries du sol appelées rhizobiums. Ce travail a pour objectif l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries nodulantes *Ononis viscosa* et *Ononis natrix*, deux espèces de plantes légumineuses collectées dans la région de Constantine (Nord-Est algérien). Les bactéries isolées à partir des nodules ont été soumises à des analyses morphologiques, biochimiques et physiologiques (tests enzymatiques, tolérance au pH, à la température et à la salinité). L'étude a révélé une diversité notable parmi les souches, certaines montrent une grande tolérance aux stress abiotiques (pH extrêmes, salinité élevée, températures allant jusqu'à 42 °C) et une capacité à produire des enzymes hydrolytiques variées. Ces résultats suggèrent que les isolats présentent des caractéristiques proches des bactéries à croissance rapide (BNL), bien qu'une identification taxonomique précise reste à approfondir.

**Mots clés :** Symbiose; BNL; *Ononis viscosa*; *Ononis natrix*; Caractérisation phénotypique.

## **Abstract**

The legume family plays a fundamental role in improving soil fertility through its ability to establish a symbiotic relationship with soil bacteria known as rhizobia. This study aims to isolate and phenotypically characterize nodulating bacteria associated with the roots of *Ononis viscosa* and *Ononis natrix*, two species collected from the Constantine region (Northeast Algeria). The bacteria isolated from the nodules were subjected to morphological, biochemical, and physiological analyses (enzyme tests, tolerance to pH, temperature and salinity). The study revealed notable diversity among the strains, with some showing high tolerance to abiotic stresses (extreme pH, high salinity, temperatures up to 42 °C) and the ability to produce a range of hydrolytic enzymes. These results suggest that the isolates exhibit characteristics similar to fast-growing nodulating bacteria (BNL), although precise taxonomic identification still requires further investigation.

**Keywords :** Symbiosis; BNL; *Ononis viscosa*; *Ononis natrix*; Phenotypic characterization.

## ملخص

تلعب عائلة البقوليات دورًا أساسيًا في تحسين خصوبة التربة بفضل قدرتها على إقامة علاقة تكافلية مع بكتيريا التربة المعروفة باسم rhizobiums. يهدف هذا العمل إلى العزل و الوصف المظهري للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية، المرتبطة بجذور نباتي *Ononis viscosa* و *Ononis natrix* وهما نوعان تم جمعهما من منطقة قسنطينة (شمال شرق الجزائر) .

تم إخضاع البكتيريا المعزولة من العُقد لتحاليل مورفولوجية، بيوكيميائية وفسولوجية (اختبارات إنزيمية، وتحمل درجات مختلفة من الحموضة، الحرارة والملوحة).

كشفت الدراسة عن تنوع ملحوظ بين السلالات، حيث أظهرت بعض العزلات قدرة عالية على تحمل الضغوط غير الحيوية (مثل درجات الحموضة القصوى، الملوحة العالية، ودرجات حرارة تصل إلى 42 درجة مئوية)، بالإضافة إلى قدرتها على إنتاج إنزيمات تحليلية متنوعة. وتشير هذه النتائج إلى أن العزلات تُظهر خصائص قريبة من البكتيريا المُعقدة سريعة النمو، رغم أن التحديد التصنيفي الدقيق لا يزال بحاجة إلى المزيد من الدراسة.

**الكلمات المفتاحية :** تعايش؛ بكتيريا العقد الجذرية؛ *Ononis viscosa*؛ *Ononis natrix*؛ وصف مظهري.

## **Liste des abréviations**

**Asso.** Le botaniste Ignacio Jordán de Asso y del Río

**ATP:** Adenosine Triphosphate

**BCP :** Pourpre De Bromocrésol

**BNL :** Bactéries Nodulant les Légumineuses

**BTB:** Bleu De Bromothymol

**CMC:** Carboxyméthyl Cellulose

**Coss.** Le botaniste Ernest Saint-Charles Cosson

**Desf.** Le botaniste René Louiche Desfontaines

**DO :** Densité Optique

**Dur.** Le botaniste Michel Charles Durieu de Maisonneuve

**EPS :** Exopolysaccharides

**Forsk.** Le botaniste Peter Forsskål

**GPA :** Glucose Peptone Agar

**GPS:** Global Positioning System

**Guss.** Le botaniste Giovanni Gussone

**HNS :** Host Spécific Nodulation

**HSP :** Heat Shock Proteins

**LCO:** Lipochitooligosaccharide

**L.** Le botaniste Carl von Linné

**LPWG:** Legume Phylogeny Working Groupe

**NR :** Nitrate Réductase

**p/v:** Poids /Volume

**pH :** Potentiel Hydrogène

**RC:** Rouge Congo

**Ten.** Le botaniste Michele Tenore

**TY:** Tryptone Yeast

**YMA:** Yeast Mannitol Agar

**YMB:** Yeast Mannitol Broth



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Nouvelle Taxonomie des <i>Leguminosae</i> en six sous-familles (LPWG., 2017).....	4
<b>Figure 2</b> : La forme représentative d'une fleur de la famille Papilionacée (Brice, 2011).....	6
<b>Figure 3</b> : <i>Ononis natrix</i> (Dronnet, 1996).....	7
<b>Figure 4</b> : <i>Ononis viscosa</i> (flora-on.pt).....	10
<b>Figure 5</b> : Arbre phylogénétique simplifié de l'ADNr 16S des protéobactéries. Arbre basé sur la comparaison de séquences de l'ADNr16S (Masson-Boivin <i>et al.</i> , 2009).....	15
<b>Figure 6</b> : Formation de nodules racinaires lors de la symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante (Perry <i>et al.</i> , 2004).....	17
<b>Figure 7</b> : Le dialogue moléculaire entre le <i>Rhizobium</i> et la légumineuse .....	19
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des types de nodules (Adapté de Maunoury <i>et al.</i> , 2008 et Brewin, 1998).....	20
<b>Figure 9</b> : Schéma de la fixation biologique de l'azote (Biofertilisante , Fr).....	21
<b>Figure 10</b> : Localisation géographique de site de prélèvement (d-maps.com).....	22
<b>Figure 11</b> : Procédure de collecte des nodules (Beck <i>et al.</i> , 1993).....	23
<b>Figure 12</b> : Conservation des nodules.....	24
<b>Figure 13</b> : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Somasegaran et Hoben, 1994).....	26
<b>Figure 14</b> : Résultat de test de stérilisation des nodules sur milieu YMA+RC.....	32
<b>Figure 15</b> : Croissances des isolats sur milieu YMA.....	34
<b>Figure 16</b> : Croissance des isolats sur milieu YMA+RC.....	34
<b>Figure 17</b> : Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur GPA + BCP.....	35
<b>Figure 18</b> : Observation microscopique de l'isolat O.n4 .....	36
<b>Figure 19</b> : Acidification du milieu YMA+BTB par les isolats.....	36
<b>Figure 20</b> : Résultat du test de mobilité.....	37
<b>Figure 21</b> : Résultats du test de la réduction des nitates.....	39
<b>Figure 22</b> : Résultats de l'hydrolyse de l'urée chez l'isolat O.v2 et O.n1.....	40
<b>Figure 23</b> : Test de dégradation de la carboxyméthylcellulose (CMC) par des isolats bactériens.....	41
<b>Figure 24</b> : Résultats de la détection d'activité polygalacturonasique.....	42
<b>Figure 25</b> : Résultats du test de la catalase de l'isolat O.v1 et O.v4.....	43
<b>Figure 26</b> : Croissance des isolats (O. v1, O. v2, O. v3, O. v4, O. n1, O.n2 , O.n5, O.n3, O.n4) à des températures différentes.....	45
<b>Figure 27</b> : Effet du pH sur la croissance des isolats.....	47
<b>Figure 28</b> : Croissance des isolats (O.n1, O.n2, O.n5, O.v1, O.v2, O.v3, O.v4, O.v5) à différentes concentrations d'NaCl.....	50

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Présentation de l'espèce <i>Ononis natrix</i> .....	8
<b>Tableau2 :</b> Présentation de l'espèce <i>Ononis viscosa</i> .....	11
<b>Tableau 3 :</b> Isolats utilisés dans cette étude.....	33
<b>Tableau 4 :</b> Observation de la croissance des isolats à différentes températures.....	44
<b>Tableau 5 :</b> Observation de la croissance des isolats à différentes concentration de l'NaCl.....	47

## Table des matières

Remerciements.....	i
Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
ملخص.....	iv
Liste des abréviations .....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Introduction .....	1

## Revue bibliographique

1. Symbiose légumineuses-rhizobia.....	2
1.1.Partenaire végétal.....	2
1.1.1.Les légumineuses.....	2
1.1.2.Classification des légumineuses.....	3
1.1.3.Caractères généraux du genre <i>Ononis</i> L .....	5
1.1.4. Description générale et classification taxonomique des espèces <i>Ononis natrrix</i> et <i>Ononis viscosa</i> .....	7
1.2.Partenaire bactérien.....	13
1.2.1.Les rhizobiums.....	13
1.2.2. Classification .....	14
1.3. La nodulation.....	15
1.3.1. Processus de nodulaion .....	15
1.3.1.1. Formation des bactéroïdes .....	16
1.3.1.2. Préinfection.....	16
1.3.1.3. Infection .....	16
1.3.1.4. Développement du nodule.....	16
1.3.2. Le dialogue moléculaire de l'interaction BNL-légumineuse.....	17
1.3.2.1. Les flavonoïdes.....	18
1.3.2.2.Les facteurs Nod .....	18
1.3.2.3. Les gènes de nodulation.....	18
1.3.3.Les différentes formes de nodule.....	19
1.3.4. La fixation biologique d'azote.....	20

## Matériel et méthodes

1.Procédure de prélèvement et de gestion des nodules .....	22
1.1. Présentation de la zone de prélèvement.....	22
1.2. Collecte des nodules .....	22
1.3. Conservation des nodules.....	23
2.Procédure d'isolement des bactéries nodulant le bugrane ( <i>Ononis viscosa</i> et <i>Ononis natrrix</i> ).....	24

2.1. Stérilisation des nodules.....	24
2.2. Test de stérilisation des nodules .....	25
2.3. Ecrasement des nodules.....	25
2.4. Isolement des souches à partir des nodules.....	25
2.5. Purification des bactéries.....	26
<b>3. Caractères morphologiques et cultureux.....</b>	<b>26</b>
3.1. Différents milieux de culture utilisés.....	26
3.2. L'examen microscopique des bactéries.....	27
3.3. Conservation des isolats.....	27
3.4. Test au bleu de Bromothymol ( vitesse de croissance).....	28
3.5. Test de mobilité.....	28
<b>4. Caractères phénotypiques.....</b>	<b>28</b>
4.1. Tests biochimiques.....	28
4.1.1. Réduction des nitrates.....	28
4.1.2. Hydrolyse de l'urée.....	29
4.1.3. Activité cellulolytique.....	29
4.1.4. Activité pectinolytique.....	29
4.1.5. Recherche de la catalase.....	30
4.2. Tests physiologiques.....	30
4.2.1. Effet de la température.....	30
4.2.2. Effet du pH.....	30
4.2.3. Tolérance à l'NaCl.....	31

## Résultats et discussion

<b>1. Isolement des rhizobiums à partir des nodules.....</b>	<b>32</b>
1.1. Test de stérilisation des nodules.....	32
1.2. Purification des bactéries.....	32
<b>2. Caractères morphologiques et cultureux.....</b>	<b>33</b>
2.1. Examen macroscopique des colonies.....	33
2.1.1. Croissance sur milieu YMA.....	33
2.1.2. Croissance sur milieu YMA+RC.....	34
2.1.3. Croissance sur milieu GPA+BCP.....	34
2.2. Examen microscopique des isolats.....	35
2.3. Test de vitesse de croissance.....	36
2.4. Test de mobilité.....	37
<b>3. Caractères phénotypiques.....</b>	<b>38</b>
3.1. Tests biochimiques.....	38
3.1.1. Réduction des nitrates.....	38
3.1.2. Hydrolyse de l'urée.....	39
3.1.3. Activité cellulolytique.....	40

3.1.4. Activité pectinolytique.....	41
3.1.5. Recherche de la catalase.....	42
3.2. Tests physiologiques.....	43
3.2.1. Effet de la température.....	43
3.2.2. Effet du pH.....	45
3.2.3. Tolérance à l' NaCL.....	47
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	51
<b>Références bibliographiques</b> .....	53
<b>Annexes</b> .....	I

# Introduction

Les Fabacées, ou légumineuses, forment une famille végétale d'importance écologique, agronomique et économique majeure. Leur capacité unique à établir une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote, principalement les rhizobia, leur confère un avantage compétitif dans des environnements pauvres en azote assimilable. Cette symbiose se manifeste par la formation de nodules racinaires, où les bactéries convertissent l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en ammoniac grâce à l'enzyme nitrogénase. La plante hôte, en retour, fournit aux bactéries des nutriments carbonés dérivés de la photosynthèse, établissant ainsi un échange mutuellement bénéfique (Poole *et al.*, 2018).

Malgré l'importance de ces interactions symbiotiques, une grande partie des recherches demeure concentrée sur un nombre restreint d'espèces cultivées. À l'inverse, de nombreuses légumineuses sauvages locales restent peu étudiées, bien qu'elles puissent constituer des réservoirs de souches bactériennes efficaces, adaptées à des conditions édaphiques spécifiques. C'est notamment le cas des espèces du genre *Ononis* L. (*Ononis viscosa* et *Ononis natrix*), deux espèces spontanées présentes dans les zones méditerranéennes, dont les microsymbiotes restent largement méconnus.

Dans le cadre de l'étude des symbioses fixatrices d'azote chez les légumineuses sauvages, ce mémoire se concentre sur la caractérisation d'isolats d'endophytes prélevés à partir des nodules des deux espèces du genre *Ononis* L.

Les objectifs principaux sont:

Isoler et caractériser phénotypiquement les bactéries nodulaires associées à la légumineuse *Ononis viscosa* et *Ononis natrix*, espèce encore peu étudiée au niveau national.

Étudier la relation symbiotique entre cette plante et ses bactéries infectrices à travers des analyses morphologiques, culturales, biochimiques et physiologique des isolats obtenu.

# **Chapitre 1**

## **Revue**

### **bibliographique**



## **1. Symbiose légumineuses-rhizobia**

### **1.1. Partenaire végétal**

#### **1.1.1. Les légumineuses**

Les Fabacées, également appelées légumineuses, représentent la troisième plus grande famille de plantes après les Astéracées et les Orchidacées, avec environ 791 genres et entre 19 325 et 19 560 espèces (Jiang *et al.*, 2019). Ces plantes se distinguent par leurs fruits enfermés dans des gousses, qui peuvent se présenter sous des formes et des couleurs variées (Ékopédia, 2015).

À partir du début du XIX siècle, les botanistes ont distingué trois sous-familles au sein des légumineuses : les Papilionacées, caractérisées par des fleurs irrégulières comme celles du haricot ; les Césalpiniées et les Mimosées (Doyel et Luckow, 2003).

D'un point de vue écologique, les légumineuses ont une répartition ubiquitaire et jouent un rôle essentiel dans presque tous les biomes de la planète, y compris les environnements les plus extrêmes. Elles sont particulièrement diversifiées et abondantes dans les forêts tropicales humides de plaine. Elles dominent également les forêts sèches, les savanes tropicales, ainsi que les milieux méditerranéens et d'autres régions tempérées, s'étendant jusqu'aux hautes latitudes et aux altitudes élevées.

Leur diversité morphologique est impressionnante : elles peuvent être de grands arbres tropicaux émergents, de petites herbes annuelles éphémères, des plantes grimpantes annuelles ou vivaces munies de vrilles, des arbustes désertiques, des lianes ligneuses, et plus rarement, des espèces aquatiques (Legume Data Portal, 2021).

L'azote est un élément essentiel au développement des légumineuses. Bien qu'il constitue 78% de l'air sous forme de diazote (N<sub>2</sub>) atmosphérique, ces plantes ne peuvent pas l'assimiler directement. Son absorption nécessite une interaction symbiotique entre des organismes eucaryotes et procaryotes, connue sous le nom de symbiose légumineuses-rhizobia, décrite pour la première fois par Frank en 1889. L'association entre les légumineuses et les bactéries (BNL) permet aux plantes d'acquérir la capacité de fixer directement l'azote atmosphérique, une faculté que les autres plantes supérieures ne possèdent pas. Cette symbiose conduit à la formation de nodules au niveau des racines, au sein desquels les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, captent l'azote de l'air et le transforme en une forme assimilable par la plante. En échange, la plante fournit aux bactéries des éléments nutritifs essentiels à leur développement (Berger, 2019).

La symbiose entre les légumineuses et les rhizobiums permet à ces plantes de prospérer dans des sols pauvres en azote. Dans les écosystèmes naturels, la fixation d'azote

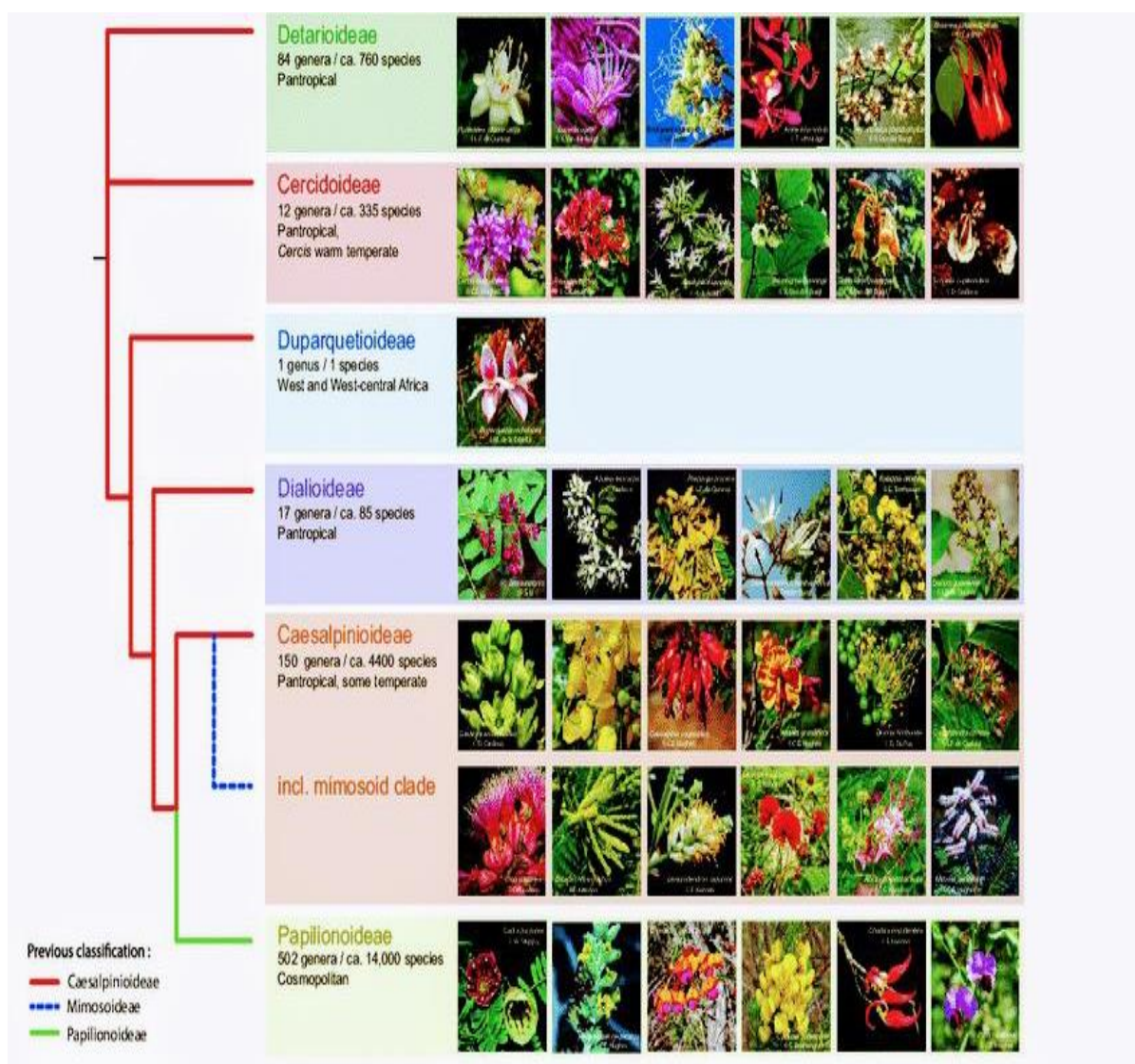
par les légumineuses est estimée entre 28 et 84 kg par hectare par an, tandis qu'en agriculture, elle peut dépasser plusieurs centaines de kilogrammes par hectare (Guldan *et al.*, 1996).

Grâce à leur capacité à accumuler de fortes concentrations d'azote dans leurs tissus, les légumineuses permettent l'amélioration des systèmes agricoles et la préservation de la fertilité des sols. Elles participent activement à la protection des sols contre l'érosion, la désertification et leur dégradation, elles contribuent également à fragiliser le sol des roches, facilitant ainsi l'altération et la formation du sol.

les légumineuses jouent un rôle important dans le maintien des équilibres écologiques, notamment en servant d'habitat et de source de nourriture pour de nombreux insectes pollinisateurs et entomophages. Leurs fleurs attirent les abeilles, bourdons, papillons et autres insectes utiles, contribuant ainsi à la pollinisation croisée et à la régulation biologique des ravageurs dans les écosystèmes agricoles et naturels.

### **1.1.2. Classification des légumineuses**

La classification traditionnelle des Légumineuses en trois sous-familles (*Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae*) a été significativement révisée en 2017. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG), s'appuyant sur l'analyse du gène plastidial matK, a proposé une nouvelle structure phylogénétique plus fiable et largement adoptée, reconnaissant désormais six sous-familles distinctes et des groupes évolutifs bien définis (LPWG, 2017) (Figure 1).



**Figure 1:** Nouvelle Taxonomie des Légumineuses en six sous-familles (LPWG, 2017)

Cette nouvelle classification de la famille des légumineuses, représentant l'opinion unanime de la communauté internationale de la systématique des légumineuses, aborde le problème de la non-monophylie connue depuis longtemps de la sous-famille reconnue *Caesalpinioideae*, en reconnaissant six sous-familles monophylétiques qui repose sur un support robuste. L'ancienne sous-famille des *Mimosoideae* est nichée au sein de la *Caesalpinioideae* circonscrite et est désigné de manière informelle comme le clade Mimosoide.

- *Duparquetioideae* (LPWG, 2017) : regroupe un seul genre et une seule espèce
- *Cercidoideae* (LPWG, 2017) : comprend 12 genres totalisant environ 335 espèces
- *Detarioideae* (DC.) : rassemble 84 genres pour environ 760 espèces
- *Dialioideae* (LPWG, 2017) : inclut 17 genres regroupant près de 85 espèces
- *Caesalpinioideae* (DC.) : englobant également la clade des *Mimosoideae*, cette sous famille compte 148 genres reconnus et environ 4 400 espèces

- *Papilionoideae* (DC.) : la plus diversifiée en termes de genres, avec 503 genres et environ 14 000 espèces

Parmi les plantes de la famille des Fabacées, on trouve le genre *Ononis* L., également connu sous le nom de bugrane (Chedida dans le dialecte local).

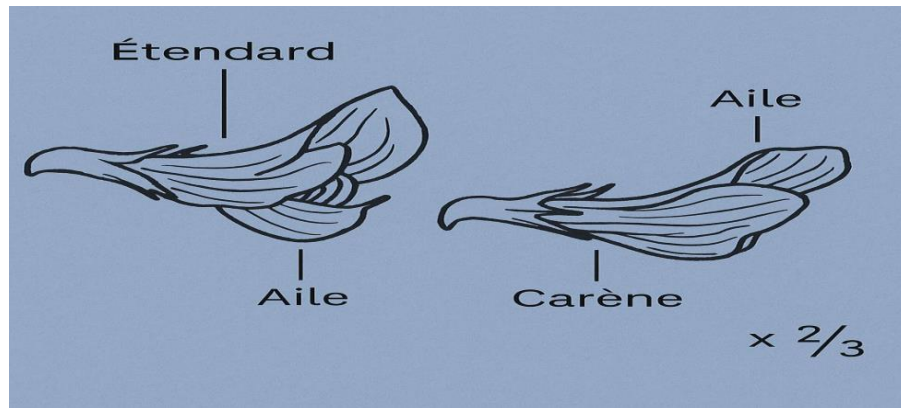
### 1.1.3. Caractères généraux du genre *Ononis* L.

La Bugrane, ou *Ononis* L., est une plante dont le nom scientifique trouve son origine dans le grec *onos*, signifiant « âne », probablement en référence à l'effort ou au travail, en métaphore de cet animal de labour friand de cette plante. Le nom français bugrane, quant à lui, dérive du latin vulgaire *boveretina*, issu de *bos* (bœuf) et *retiner* (arrêter), ce qui fait référence à la robustesse de la plante capable de freiner le passage des bœufs dans les champs (Prodel, 2022).

*Ononis* L. est un grand genre de la famille des *Fabaceae*, sous-famille des *Papilionoideae* (*Faboideae*), tribu des *Ononideae*. Il a été décrit pour la première fois par Linné en 1753-1754, qui en a identifié 17 espèces. Aujourd'hui, ce genre comprend environ 75 à 86 espèces réparties à travers le monde, notamment dans la région méditerranéenne, l'Europe, l'Asie centrale et les îles Canaries (Turini *et al.*, 2010).

Ce genre botanique se distingue par des fleurs très caractéristiques. Elles possèdent cinq pétales disposés de manière spécifique : le pétale supérieur, plus large et généralement dressé, forme ce que l'on appelle l'étendard. Les deux pétales latéraux, plus étroits, sont appelés les ailes. Enfin, les deux pétales inférieurs, qui enveloppent les étamines en faisceau, constituent la carène (Figure 2). Le fruit est une gousse, dont la taille peut varier, mais qui ressemble toujours à un haricot. Les fleurs sont le plus souvent alternes, pourvues de stipules. Toutefois, les deux feuilles supérieures peuvent parfois être presque opposées. Elles sont pédonculées et présentent généralement trois folioles, ou bien sont composées de plusieurs folioles disposées en forme de plume (composition pennée) (Brice, 2011).

Ces plantes se développent souvent comme des mauvaises herbes dans les terres cultivées. Leurs tiges rigides peuvent empêcher le passage des outils agricoles, ce qui leur a valu le surnom d'« arrête-bœuf ». En herboristerie, *Ononis* L. est connue pour ses propriétés médicinales, notamment dans le traitement des affections urinaires, les racines de bugrane épineuse ont une action diurétique et calment l'inflammation des voies urinaires. Elles sont souvent intégrées, sous forme de broyat, dans les tisanes diurétiques (Margot et Roland spohn, 2009).



**Figure 2 :** La forme représentative d'une fleur de la famille *Papilionacée* (Brice, 2011)

Le genre *Ononis* L. est bien représenté en Algérie, où il occupe une place importante dans la flore locale.

On trouve différentes espèces qui se sont adaptées à divers environnements (Quezel et Santa, 1963) :

- *Ononis cenisia* L.
- *Ononis spinosa* L.
- *Ononis aragonensis* Asso.
- *Ononis pusilla* L.
- *Ononis natrix* L.
- *Ononis biflora* Desf.
- *Ononis antennata* Pomel.
- *Ononis viscosa* L.
- *Ononis laxiflora* Desf.
- *Ononis pendula* Desf.
- *Ononis variegata* L.
- *Ononis alba* Poiret.
- *Ononis avellana* Pomel.
- *Ononis villosissima* Desf.
- *Ononis. Hirta* Desf.
- *Ononis cephalantha* Pomel.
- *Ononis cossoniana* Bois.
- *Ononis fruticosa* L.
- *Ononis hispida* Desf.
- *Ononis minutissima* L.
- *Ononis serotina* Pomel.
- *Ononis ornithopodioides* L.
- *Ononis sicula* Guss.
- *Ononis pubescens* L.
- *Ononis incisa* Coss.
- *Ononis reclinata* L.
- *Ononis euphrasiaefolia* Desf.
- *Ononis alopecuroides* L.
- *Ononis crinita* Pomel.
- *Ononis rosea* Dur.
- *Ononis serrata* Forsk.
- *Ononis. Mitissima* L.
- *Ononis diffusa* Ten.

Parmi ces espèces, les plus endémiques en Algérie sont *Ononis sicula* Guss., *Ononis pusilla* L., *Ononis alba* Poiret, *Ononis crinita* Pomel, *Ononis avellana* Pomel, *Ononis megalostachys* Munby et *Ononis mitissima* L. ( Quezel et Santa, 1963).

**1.1.4. Description générale et classification taxonomique des espèces *Ononis natrix* et *Ononis viscosa***

**a- *Ononis natrix***



**Figure 3 : *Ononis natrix* (Dronnet ,1996)**

**- Classification (MNHN.INPN.FR)**

- **Règne** : Plantae Haeckel
- **Classe** : Equisetopsida C.Agardh
- **Clade** : Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith
- **Clade** : Spermatophyta
- **Sous-Classe** : Magnoliidae Novák ex Takht
- **Super-Ordre** : Rosanae Takht
- **Ordre** : Fabales Bromhead
- **Famille** : Fabaceae Lindl
- **Sous-Famille** : Papilionoideae DC.
- **Super-Tribu** : Robinioids
- **Genre** : *Ononis* L.
- **Espèce** : *Ononis natrix* L.

**Tableau 1 :** présentation de l'espèce *Ononis natrix*

<b>Nomenclature</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bugrane à folioles inégales (Français)</li> <li>• Bugrane gluante, Bugrane jaune, Bugrane fétide, Coquesigrue (Français)</li> <li>• Yellow Restharrow (Anglais)</li> </ul> <p>(www.florealpes.com)</p> <p>En Algérie, il est localement connu sous le nom de Chedida ( Quzel et Santa, 1963)</p>
<b>Type végétatif</b>	<p>Plante herbacée vivace à souche sous-ligneuse (20-50 cm).</p> <p>(http://erick.dronnet.free.fr/belles_fleurs_de_france/ononis_natrix.htm)</p>
<b>Description botanique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possède une tige dressée, ramifiée, munie d'épines et recouverte de poils collants.</li> <li>• Les feuilles sont le plus souvent trifoliolées, avec des folioles ovales et dentées.</li> <li>• Fleurs jaunes striées de pourpre de grande taille (14 à 16 mm de long), sont solitaires, dressées à étalées, regroupées en panicules feuillues.</li> <li>• Elles possèdent un pédoncule très allongé et un calice densément velu.</li> <li>• La corolle est jaune, deux fois plus longue que le calice, avec un étendard marqué de stries pourprées. L'androcée est monadelphie.</li> <li>• Le fruit est une gousse pendante, mesurant entre 1,5 et 2 cm de long.</li> </ul> <p>(http://erick.dronnet.free.fr/belles_fleurs_de_france/ononis_natrix.htm)</p>
<b>Floraison</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• De mai à juillet</li> </ul> <p>(https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44839-synthese)</p>

**Tableau 1** : présentation de l'espèce *Ononis natrix* (suite)

<p><b>Tolérance aux facteurs abiotiques</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La bugrane jaune (<i>Ononis natrix</i>) se distingue par sa grande robustesse. Elle supporte des températures allant jusqu'à -10 °C, ce qui en fait une plante adaptée aux climats modérément froids. Dans les régions où les hivers sont plus rigoureux, un paillage au pied de la plante est conseillé pour protéger les racines du gel. Selon Willemse, il est préférable de l'installer dans un endroit naturellement abrité des vents froids.</li> <li>• Côté sécheresse, <i>Ononis natrix</i> est également remarquable : une fois bien enracinée, elle s'adapte facilement aux faibles précipitations et demande très peu d'arrosage. Elle constitue ainsi un excellent choix pour les jardins secs ou les régions arides. En cas de sécheresse prolongée, un système d'arrosage goutte-à-goutte peut suffire à maintenir sa vitalité.</li> </ul> <p>(<a href="https://www.willemsefrance.fr/collections/bugrane-jaune-ononis-natrix-lat?utm">https://www.willemsefrance.fr/collections/bugrane-jaune-ononis-natrix-lat?utm</a> ).</p>
<p><b>Répartition géographique</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Europe méridionale, Asie occidentale ,Afrique septentrionale.</li> </ul> <p>(<a href="https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44839-synthese">https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44839-synthese</a>)</p>



**b- *Ononis viscosa***



**Figure 4 :** *Ononis viscosa* (flora-on.pt)

**- Classification (MNHN.INPN.FR)**

- **Règne** : Plantae Haeckel
- **Classe** : Equisetopsida C.Agardh
- **Clade** : Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith
- **Clade** : Spermatophyta
- **Sous-Classe** : Magnoliidae Novák ex Takht
- **Super-Ordre** : Rosanae Takht
- **Ordre** : Fabales Bromhead
- **Famille** : Fabaceae Lindl
- **Sous-Famille** : Papilionoideae DC.
- **Super-Tribu** : Robinioids
- **Genre** : *Ononis* L.
- **Espèce** : *Ononis viscosa* L.

**Tableau 2** : présentation de l'espèce *Ononis viscosa*

<b>Nomenclature</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Français : Bugrane visqueuse</li> <li>• Catalan : Gavó viscós</li> <li>• Italien : Ononide vischiosa</li> </ul> <p>(<a href="https://www.tela-botanica.org/">https://www.tela-botanica.org/</a>)</p>
<b>Type végétatif</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plante annuelle de 15-40 cm</li> </ul> <p>(<a href="https://www.tela-botanica.org/">https://www.tela-botanica.org/</a>)</p>
<b>Description botanique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Feuilles pétiolées : les feuilles inférieures et supérieures sont simples, tandis que celles du milieu sont trifoliolées, avec des folioles ovales ou oblongues, dentées, la foliole terminale étant portée par un petit pétiole.</li> <li>• Stipules lancéolées, plus longues que le pétiole.</li> <li>• Fleurs jaunes, assez petites, disposées à l'aisselle des feuilles en grappes longues, lâches et feuillées.</li> <li>• Pédoncules minces, articulés, plus longs que la feuille, avec une arête une à deux fois plus longue que le pédicelle.</li> <li>• Calice à lobes linéaires et à trois nervures, trois à quatre fois plus longs que le tube.</li> <li>• Corolle légèrement plus longue que le calice.</li> <li>• Gousse de 12 à 15 mm de long sur 5 à 6 mm de large, saillante, pendante, de forme oblongue-cylindrique et velue.</li> </ul> <p>(<a href="https://www.tela-botanica.org/">https://www.tela-botanica.org/</a>)</p>
<b>Floraison</b>	<p>mars à juin</p> <p>(<a href="https://www.florealpes.com/fiche_ononisviscosasubcord.php?liste=663&amp;utm">https://www.florealpes.com/fiche_ononisviscosasubcord.php?liste=663&amp;utm</a>)</p>

**Tableau 2** : présentation de l'espèce *Ononis viscosa* (suite)

<p><b>Tolérance aux facteurs abiotiques</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La Bugrane visqueuse se distingue par sa remarquable résistance au froid. Même exposée à des hivers rigoureux, elle fait preuve d'une robustesse caractéristique des espèces de son genre. Un paillage durant les périodes de gel intense peut néanmoins renforcer sa protection et favoriser sa survie hivernale.</li> <li>• Parfaitement adaptée aux environnements secs, la Bugrane visqueuse supporte très bien les épisodes de sécheresse. Sa capacité à s'épanouir dans des conditions chaudes et arides en fait une plante de choix pour les jardins peu arrosés, limitant ainsi les besoins en entretien.</li> </ul> <p>(<a href="https://www.willemsefrance.fr/">https://www.willemsefrance.fr/</a>)</p>
<p><b>Répartition géographique</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espagne et Portugal, Baléares, Sardaigne, Italie, Sicile ; Afrique septentrionale.</li> </ul> <p>(<a href="https://www.tela-botanica.org/">https://www.tela-botanica.org/</a>)</p>

## 1.2. Partenaire bactérien

### 1.2.1. Les rhizobiums

Les bactéries du genre *Rhizobium* constituent le second partenaire de l'association symbiotique Légumineuses–BNL. Le terme *Rhizobium* a été initialement utilisé pour désigner les bactéries capables de former des nodules sur les racines voire parfois sur les tiges des légumineuses où elles assurent la fixation de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) (de Lajudie *et al.*, 2019).

Ce nom, proposé par Frank en 1889, provient du grec « rhizo » signifiant racine et « bium » signifiant vivant, en référence à leur mode de vie au sein des racines.

D'un point de vue morphologique et microscopique, les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) se présentent sous forme de bâtonnets Gram négatif, mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles (polaire, subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches), aérobies, asporulées (Werner, 1992).

Selon Somasegaran et Hoben (1994), on distingue deux formes principales chez les rhizobia :

**-La forme végétative**, est constituée de bâtonnets réguliers de 1,2 à 3 µm de long et de 0,5 à 0,9 µm de large. Ces bactéries sont munies d'un flagelle polaire ou de plusieurs flagelles péritriches. Les souches à flagelles multiples présentent une croissance rapide, tandis que celles à un seul flagelle (polaire ou subpolaire) se développent plus lentement (Dupuy et Nougier, 2005).

**-La forme bactéroïde** présente à l'intérieur des nodules, correspond à une différenciation des rhizobia en cellules de morphologie variable (régulière ou irrégulière). Chez des espèces telles que *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les bactéroïdes sont irréguliers et peuvent atteindre une taille jusqu'à dix fois supérieure à celle de la forme végétative (Perry *et al.*, 2004).

Les caractéristiques des colonies dépendent du milieu de culture, du temps d'incubation et des conditions environnementales.

La texture des colonies peut varier de beurrée à élastique, et leur aspect peut être gélatineux, sec ou humide. En général, elles sont plates ou arrondies (Vincent, 1970)

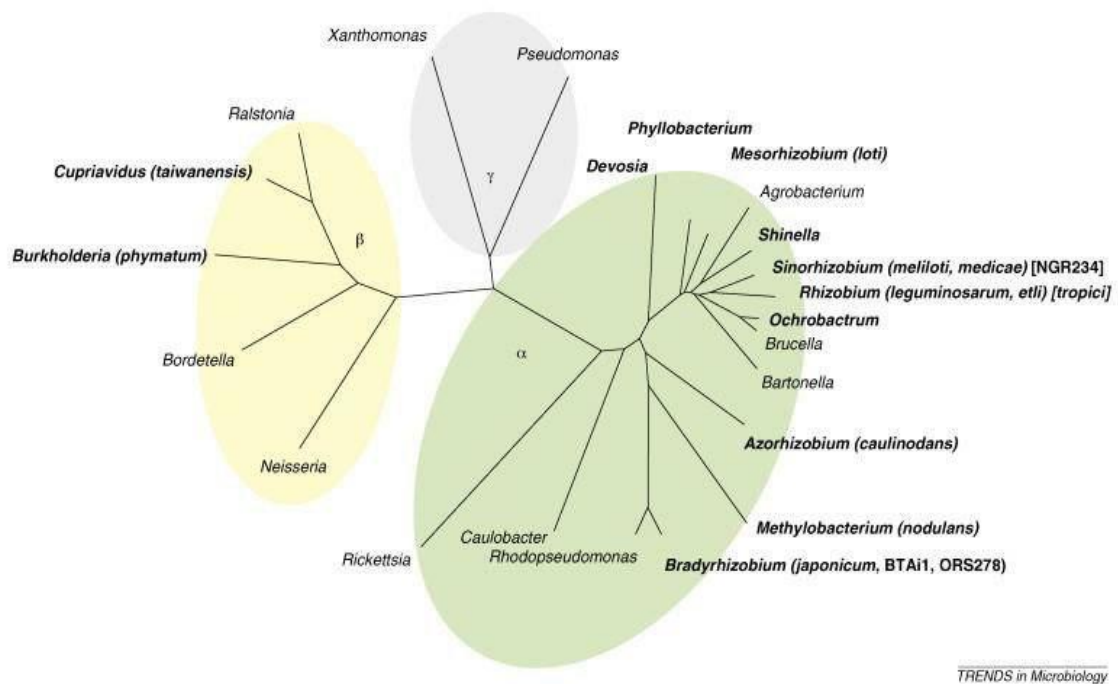
### 1.2.2. Classification

Au début des années 1980, les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote étaient toutes classées sous le genre *Rhizobium*, qui ne comptait alors que six espèces reconnues : *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* et *R. japonicum* (Somasegaran et Hoben, 1985). Depuis, les connaissances ont considérablement évolué : environ 238 espèces ont été identifiées et réparties dans 18 genres différents (Shamseldin *et al.*, 2016). Par ailleurs, en 1990, une seule espèce bactérienne était connue pour noduler le haricot commun à l'échelle mondiale : *Rhizobium leguminosarum* sv. *phaseoli* (Shamseldin *et al.*, 2016).

Cette diversification taxonomique a révélé que la majorité de ces bactéries fixatrices d'azote appartiennent à la classe des  $\alpha$ -protéobactéries, qui regroupe environ vingt familles majoritairement aérobies. Ces dernières se distinguent par leur capacité à se développer dans des environnements pauvres en nutriments (oligotrophie) et par des métabolismes inhabituels, tels que la méthylotrophie, la chimiolithotrophie et la fixation de l'azote (N) (O'Hara *et al.*, 2016). Les genres rhizobiens les plus connus sont répartis au sein de plusieurs familles de cette classe, notamment : *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Brucellaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Xanthobacteraceae* et *Hyphomicrobiaceae* (Andrews et Andrews, 2017 ; Estrada-de Los Santos *et al.*, 2018).

Une deuxième classe, celle des Bêta-protéobactéries regroupent environ douze familles partageant certaines similitudes avec les Alpha-protéobactéries, bien qu'elles se distinguent par leur capacité à utiliser des substrats issus de la décomposition organique dans des environnements anoxiques tels que les sols et les sédiments. Ces bactéries se caractérisent souvent par une polyvalence catabolique plus marquée que celle des Alpha-protéobactéries (O'Hara *et al.*, 2016). À ce jour, trois genres de Bêta-protéobactéries nodulantes ont été identifiés au sein de la famille des *Burkholderiaceae* : *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* et *Trinickia* (Andrews et Andrews, 2017 ; Estrada-de Los Santos *et al.*, 2018).

L'idée que des bactéries de la classe des Gamma-Proteobacteria puissent participer à la nodulation des racines de la plante fourragère *Hedysarum* a été évoquée dès 2004 par Benhizia et ses collaborateurs. Cette hypothèse a ensuite été appuyée par les travaux de Shiraishi *et al.* en 2010, qui ont isolé des souches de *Pseudomonas* sp. à partir des nodules de *Robinia pseudoacacia*, confirmant ainsi le potentiel nodulant de certaines Gamma-Proteobacteria (Kumar *et al.*, 2017) (Figure 5).



**Figure 5:** Arbre phylogénétique simplifié de l'ADNr 16S des protéobactéries  
Arbre basé sur la comparaison de séquences de l'ADNr 16S (Masson-Boivin, 2009)

### 1.3. La nodulation

Le nodule racinaire, ou nodosité, est un organe spécialisé résultant de la symbiose entre une plante hôte, et des bactéries fixatrices d'azote. Il constitue un site de colonisation pour ces micro-organismes symbiotiques, leur offrant un microenvironnement favorable à l'expression de l'activité de fixation biologique de l'azote atmosphérique. Ce nodule joue également un rôle clé dans les échanges métaboliques entre la plante et ses partenaires bactériens (Gobat, 2010).

#### 1.3.1. Processus de nodulation

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'infecter les plantes de la famille des légumineuses et d'induire la formation de nodules fixateurs d'azote.

Dans la grande majorité des cas, les nodules sont initiés exclusivement sur la partie racinaire de la plante hôte. Il existe toutefois, des associations symbiotiques où les nodules se développent à la fois sur la tige et sur la racine.

### 1.3.1.1. Formation des bactéroïdes

La majorité de la population bactérienne se différencie en bactéroïdes adoptant des formes variées telles que sphériques, ramifiées ou en massue. Ces bactéroïdes, enveloppés par une membrane pér bactéroïdienne, présentent une morphologie irrégulière, une taille supérieure à celle des bactéries libres, et sont incapables de se diviser (Perry *et al.*, 2004). Comme illustré dans la figure 6.

### 1.3.1.2. Préinfection

La nodulation débute par un échange moléculaire spécifique entre la plante hôte et les bactéries du genre *Rhizobium*. Lorsqu'une carence en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) est détectée, les racines des légumineuses libèrent des flavonoïdes dans la rhizosphère (Patriarca *et al.*, 2004). Ces composés agissent comme signaux pour les bactéries, induisant l'activation des gènes nod, responsables de la synthèse des facteurs Nod, des lipochitoooligosaccharides (LCO) (Dénarié, 2000). Ces molécules sont essentielles à l'initiation du processus de nodulation, car elles déclenchent les réponses morphogénétiques de la plante (Patriarca *et al.*, 2004). La diversité structurale des facteurs Nod, propre à chaque espèce de *Rhizobium*, détermine la spécificité de l'interaction et la compatibilité entre la bactérie et son hôte (Moschetti *et al.*, 2005).

### 1.3.1.3. Infection

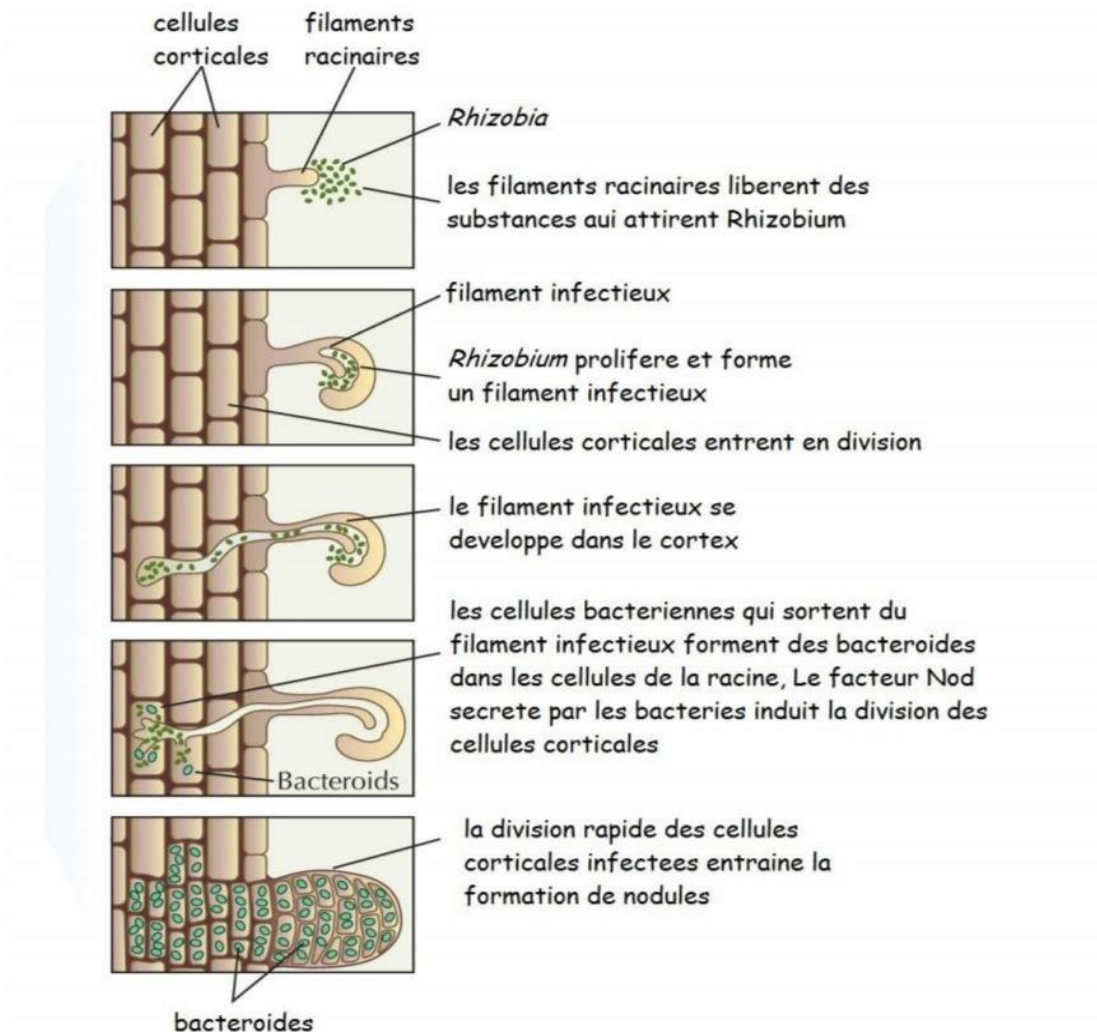
Après attraction chimique, les bactéries s'ancrent aux poils absorbants et y induisent la production d'hormones végétales telles que les acides gibbérellique et indole-acétique, provoquant un relâchement de la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005). Cette modification structurale, associée à la déformation du poil, permet l'invasion bactérienne.

En réponse, une prolifération coordonnée des cellules corticales et péricycliques conduit à la formation d'un nodule symbiotique (Rasanen, 2002).

### 1.3.1.4. Développement de nodule

Au niveau des poils absorbants, des vésicules issues de l'appareil de Golgi forment un cordon d'infection qui guide les bactéries vers les cellules internes de la racine (Dupuy et Nougier, 2005). Ce cordon progresse dans le cortex, déclenchant la division des cellules corticales sous l'effet des cytokinines bactériennes, ce qui provoque un épaississement localisé de la racine et initie la formation du nodule (Bélanger, 1998).

La dernière phase de la formation du nodule correspond à la libération des rhizobiums depuis les cordons d'infection dans les cellules corticales. Ces bactéries subissent ensuite des divisions et se différencient en bactéroïdes, des formes spécialisées capables de fixer l'azote (Machrafi, 2001) (Figure 6).



**Figure 6 :** Formation de nodules racinaires lors de la symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004)

### 1.3.2. Le dialogue moléculaire de l'interaction BNL-légumineuse

La mise en place de la symbiose entre une plante-hôte et une bactérie repose sur un échange précis de signaux moléculaires (Figure 7). Les racines de la plante libèrent des



flavonoïdes, qui agissent comme premiers signaux. Ces molécules sont reconnues spécifiquement par les protéines régulatrices NodD présentes chez la bactérie. Cette reconnaissance active l'expression des gènes de nodulation (gènes *nod*), dont les produits participent à la synthèse des facteurs Nod. Ces derniers, produits par les rhizobia, sont perçus par des récepteurs spécifiques de la plante. Les facteurs Nod déclenchent la courbure des poils absorbants racinaires, un signal clé pour l'infection bactérienne et la colonisation de la plante, conduisant à la formation des nodules racinaires (Dénarié *et al.*, 1996).

#### 1.3.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires aromatiques sécrétés par les racines des plantes dans la rhizosphère. Plus de 4 000 flavonoïdes ont été identifiés, et la plupart jouent un rôle clé dans la spécificité des interactions entre la plante hôte et son symbiote. Chaque espèce végétale libère un mélange unique de flavonoïdes, incluant notamment les isoflavonoïdes, caractéristiques des légumineuses (Perret *et al.*, 2000).

#### 1.3.2.2. Les facteurs Nod

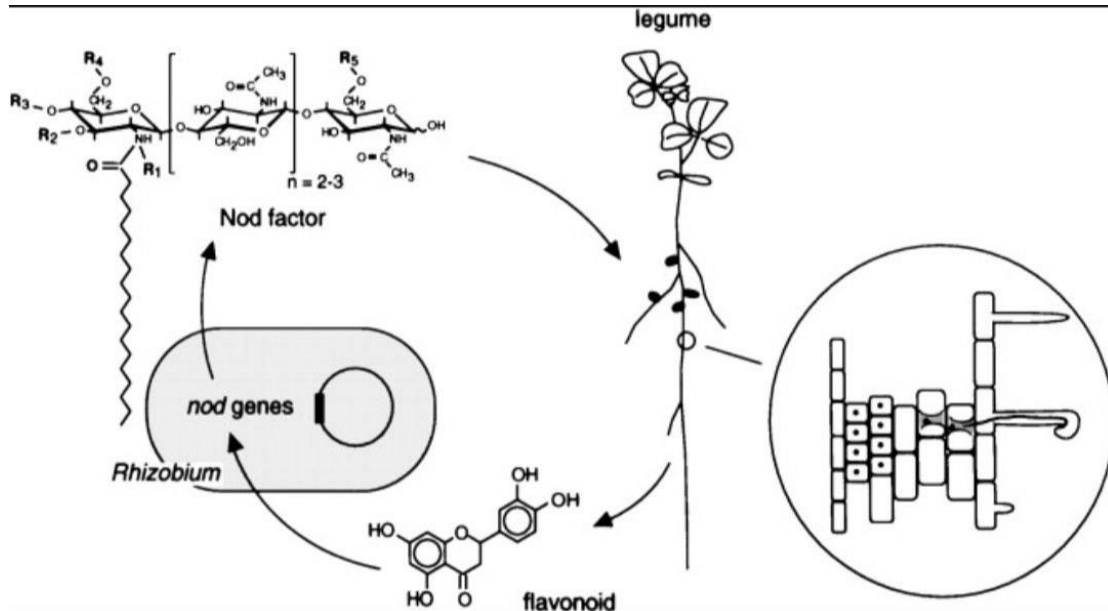
Les facteurs Nod sont des lipochitoooligosaccharides, formés de plusieurs unités de N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons  $\beta$ -1,4, et associés à une chaîne d'acide gras à leur extrémité non réduite. Leur structure varie selon plusieurs éléments : la longueur de la chaîne oligosaccharidique (composée de 3 à 5 résidus), la nature de la chaîne d'acide gras, et les modifications chimiques (comme des groupements acétyl, arabinosyl, fucosyl, mannosyl ou sulfate) apportées aux résidus d'oligosaccharides. Ces variations structurales confèrent aux facteurs Nod leur spécificité d'action (Perret *et al.*, 2000).

#### 1.3.2.3. Les gènes de nodulation

**Le gène *nodD*** : est le premier activé au début du processus de la nodulation. Il code pour une protéine qui, en réponse aux flavonoïdes sécrétés par la plante hôte, déclenche l'activation des autres gènes *nod*. Ces gènes jouent donc un rôle essentiel dans l'initiation de la symbiose (Spaink, 2000).

**Gènes *nod* communs ou structuraux** : les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont des gènes impliqués dans la synthèse du squelette oligosaccharidique des facteurs Nod, des molécules signal produites par les rhizobia et indispensables à la formation des nodules. Ils sont présents chez la plupart des espèces de rhizobia (Dénarié *et al.*, 1996).

**Gènes nod spécifiques ou hsn (host specific nodulation) :** Ces gènes interviennent dans les modifications spécifiques apportées à la structure de base des facteurs Nod. Ces variations permettent à la bactérie d'interagir avec des plantes hôtes particulières, assurant ainsi la spécificité de la symbiose (Perret *et al.*, 2000).



**Figure 7:** Le dialogue moléculaire entre le *Rhizobium* et la légumineuse. Le zoom illustre un cordon d'infection traversant le cortex racinaire, menant à un groupe de cellules en division, qui donnera naissance au primordium nodulaire (Lindström *et al.*, 2010).

### 1.3.3. Les différentes formes de nodule

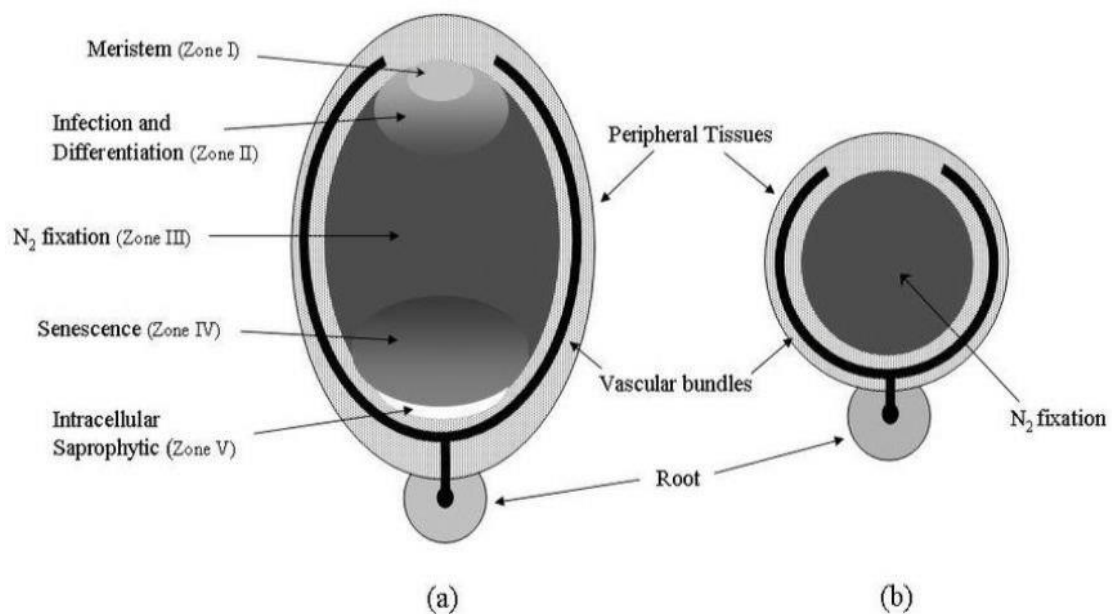
La morphologie des nodules formés sur les racines des légumineuses est essentiellement déterminée par la plante hôte, tandis que l'efficacité de la fixation biologique de l'azote dépend surtout de la bactérie symbiotique (Sprent, 2009). Deux grands types de nodules sont distingués selon l'espèce végétale : les nodules indéterminés et les nodules déterminés (Hirsch, 1992 ; Foucher et Kondorosi, 2000) (Figure 8).

Les nodules indéterminés, observés chez des légumineuses tempérées telles que le pois, la luzerne (*Medicago sativa*) ou le trèfle, se développent à partir du cortex interne et conservent un méristème apical actif. Cela leur permet une croissance continue, d'où leur forme allongée ou en bâton. Ces nodules présentent un gradient de différenciation, avec différentes étapes du développement coexistant dans une même structure (Hirsch, 1992 ; Crespi et Galvez, 2000).

En revanche, les nodules déterminés, typiques des légumineuses tropicales comme le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), ou le niébé (*Vigna unguiculata*), se

forment à partir du cortex externe et perdent rapidement leur activité méristématique. Leur croissance résulte de l'élargissement cellulaire, ce qui leur donne une forme sphérique (Hirsch, 1992 ; Foucher et Kondorosi, 2000).

Certaines plantes, telles que *Sesbania rostrata*, peuvent former à la fois des nodules déterminés et indéterminés selon les conditions environnementales (Fernandez *et al.*, 1998). D'un point de vue physiologique, les nodules indéterminés exportent l'azote principalement sous forme d'asparagine et de glutamine, tandis que les nodules déterminés le font majoritairement sous forme d'uréides (Vernie, 2008).



**Figure 8:** Représentation schématique des types de nodules (a) indéterminés et (b) déterminés. Adapté de Maunoury *et al.* (2008) et Brewin (1998).

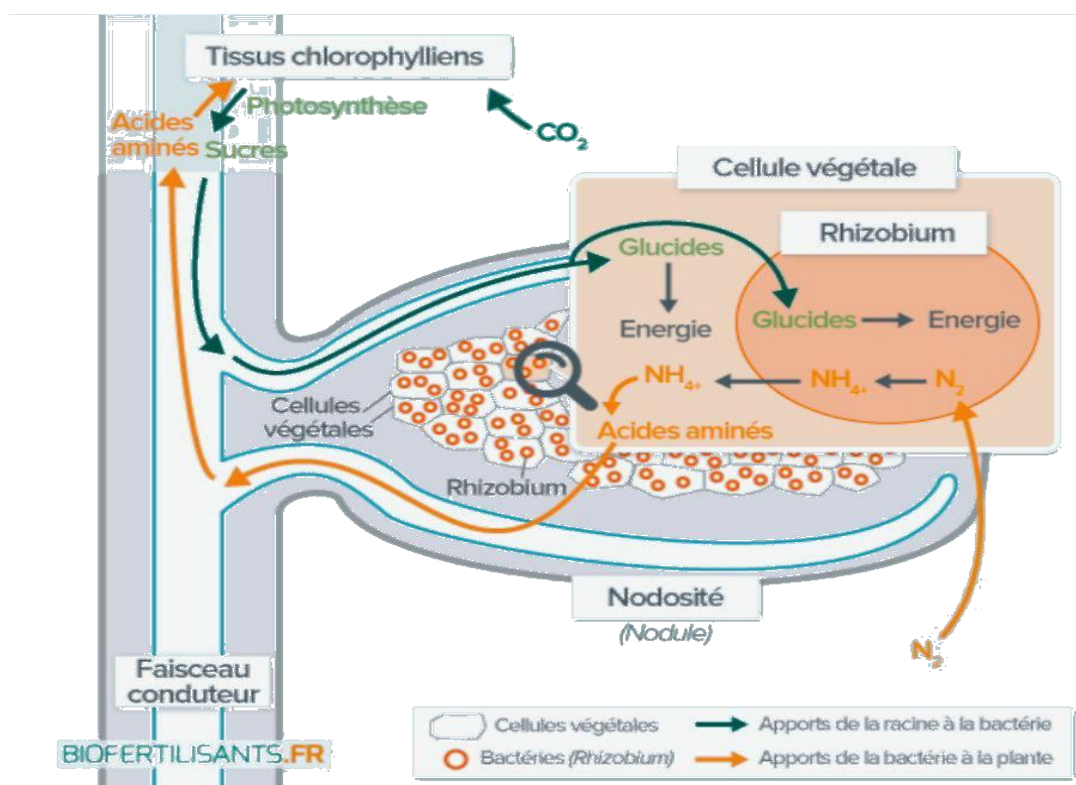
#### 1.3.4. La fixation biologique d'azote

L'azote, considéré comme l'un des éléments nutritifs essentiels aux plantes, joue un rôle fondamental dans leur développement. Il est souvent le facteur limitant de leur croissance.

Cette forme n'est pas directement utilisable par les plantes, sauf chez les légumineuses qui peuvent y accéder grâce à une association avec certaines bactéries (Roger *et al.*, 1996). Ce sont des micro-organismes comme des bactéries, des cyanobactéries ou certains champignons microscopiques qui transforment l'azote de l'air en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), une forme assimilable, à l'aide d'une enzyme appelée nitrogénase

(Tourte *et al.*, 2005 ) (Figure 9). Ce processus, appelé fixation biologique de l'azote, permet de fixer environ 170 millions de tonnes d'azote par an (Roger *et al.*, 1996). La réaction demande beaucoup d'énergie (16 molécules d'ATP par molécule de  $N_2$ ) et produit de l'ammoniac et de l'hydrogène. Certaines bactéries le font seules, en utilisant la lumière, mais d'autres, comme les rhizobiums, doivent vivre en symbiose avec des plantes, qui leur fournissent l'énergie nécessaire. La symbiose entre les rhizobiums et les légumineuses est la plus connue et permet une fixation très efficace (Roger *et al.*, 1996).

Cette fixation est réalisée par un complexe enzymatique appelé dinitrogénase, composé de deux protéines ,la protéine molybdoferredoxine (Mo-Fe) et la protéine azoferredoxine (Fe) codées par des gènes nif dont le nombre varie selon la bactérie (Basu et Kumar, 2020). Même si ces bactéries ont besoin d'oxygène pour vivre, la plante crée autour d'elles un environnement sans oxygène pour protéger l'enzyme, qui y est très sensible (Basu et Kumar, 2020). Ce mécanisme joue un rôle clé dans la fertilité des sols et dans l'apport naturel d'azote à la biosphère (Zakhia, 2004 ; Roger *et al.*, 1996).



**Figure 9** : Schéma de la fixation biologique de l'azote ( Biofertilisante, Fr).

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Procédure de prélèvement et de gestion des nodules

### 1.1. Présentation de la zone de prélèvement

Notre travail porte sur les nodules racinaires des plantes *Ononis viscosa* et *Ononis natrix*, poussant dans la région de Constantine (Algérie) (Figure 10), plus précisément dans deux communes : Quatre Chemins et Zouaghi.

Les coordonnées GPS de ces deux sites d'étude sont les suivantes :

- Quatre Chemins

Latitude : 36.25809° N et longitude : 6.6038° E

- Zouaghi

Latitude : 36° 18' 38" N et longitude : 6° 37' 10" E

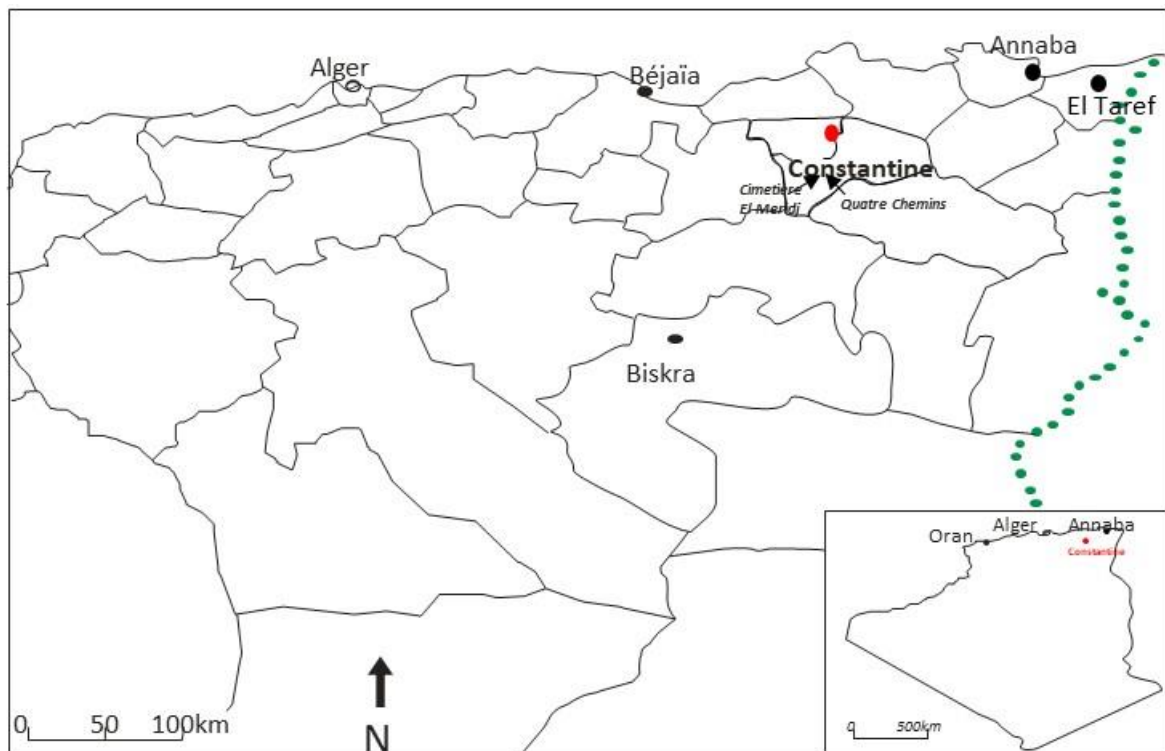


Figure 10 : Localisation géographique de site de prélèvement .

### 1.2. Collecte des nodules

La collecte des nodules doit être réalisée durant une période précise, où la plante est en pleine activité physiologique. Cette opération est généralement effectuée au printemps, durant le mois d'avril, moment où les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines.

Le protocole suivi combine les recommandations de Vincent (1970), Beck *et al.* (1993), ainsi que celles de Somasegaran et Hoben (1994). À l'aide d'une bêche, un cercle d'environ 15 cm de rayon est tracé autour de la plante, puis une section du sol est découpée

sur une profondeur d'au moins 20 cm. Le bloc de sol contenant la plante est soulevé lentement afin de préserver l'intégrité de l'appareil racinaire (Figure 11).

La terre est ensuite retirée manuellement avec précaution pour ne pas endommager les racines ni les nodules, qui peuvent être localisés aussi bien sur la racine principale que sur les racines secondaires. La plante entière et le sol rhizosphérique sont placés séparément dans des sacs en plastique.

Au laboratoire, la partie aérienne de la plante est retirée, et les racines sont lavées soigneusement à l'eau courante à faible pression. Les nodules sont ensuite prélevés en les coupant à environ 2 mm du site d'attache, puis ils sont séchés à l'aide de papier absorbant. Cette méthode permet de récolter un maximum de nodules intacts et représentatifs de la symbiose fixatrice d'azote.



**Figure 11:** Procédure de collecte des nodules (Beck *et al.*, 1993). (a) Nettoyage des racines et des nodules à l'eau, (b) Etape de prélèvement des nodules sur les racines.

### 1.3. Conservation des nodules

Les nodules collectés ont été conservés dans des conditions adaptées, en fonction de la durée de stockage souhaitée, afin de préserver leur viabilité pour les analyses ultérieures.

Pour une conservation de courte durée, destinée à une utilisation immédiate, les nodules frais sont d'abord délicatement séchés à l'aide de papier absorbant, puis stockés au réfrigérateur à une température de 4 °C pendant une période allant de 24 à 48 heures. Il est strictement déconseillé de les congeler, car la formation de cristaux de glace peut endommager leur structure et compromettre leur intégrité.

En revanche, pour une conservation prolongée (de 6 à 12 mois), la dessiccation est recommandée, selon le protocole décrit par Vincent (1970) et Somasegaran & Hoben

(1994). Cette méthode consiste à remplir à moitié des flacons stériles avec du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), qui agit comme agent desséchant en absorbant l'humidité.

Un morceau de coton est ensuite placé au-dessus du sel, et les nodules sont déposés délicatement sur ce support (Figure 12).

Chaque flacon doit être étiqueté avec le nom de la plante, le lieu et la date de prélèvement, ainsi que la date de mise en conservation.

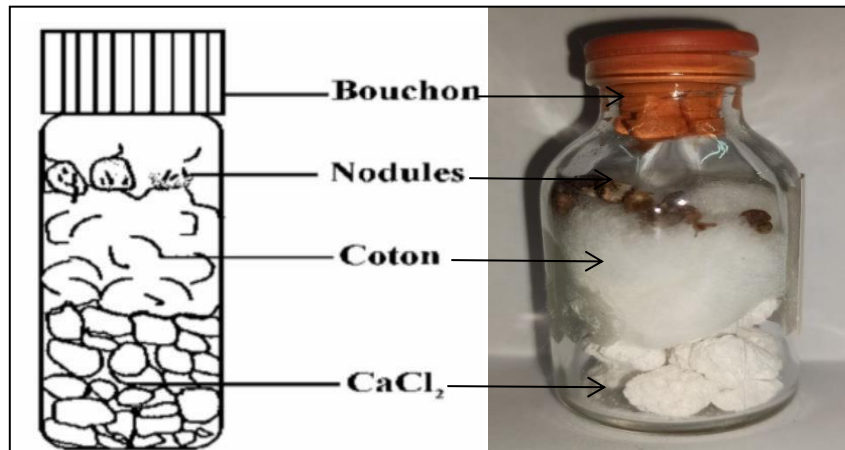


Figure 12 : Conservation des nodules

## 2. Procédure d'isolement des bactéries nodulant le bugrane (*Ononis viscosa* et *Ononis natrix*)

### 2.1. Stérilisation des nodules

Les nodules conservés ont été d'abord réhydratés dans de l'eau distillée stérile, placés au réfrigérateur à 4 °C pendant une nuit, puis laissés à température ambiante pendant une heure avant d'être stérilisés. Les nodules fraîchement collectés ont été stérilisés immédiatement après leur récolte.

La stérilisation a été réalisée sous hotte à flux laminaire. Dans les deux cas (nodules conservés et fraîchement collectés), les échantillons ont été d'abord immergés dans de l'éthanol à 95 % pendant 5 à 10 secondes, puis transférés immédiatement dans une solution d'hypochlorite de sodium  $\text{NaClO}$  à 3 % (p/v) pendant 3 minutes. Après cette étape, les nodules ont été rincés dix fois à l'eau distillée stérile.



## **2.2. Test de stérilisation des nodules**

Le test de stérilisation est réalisé afin de vérifier l'efficacité de la méthode appliquée et de confirmer la stérilité externe des nodules. Pour cela, un nodule préalablement stérilisé est frotté à la surface d'un milieu YMA additionné de rouge Congo (Annexe 01), puis incubé à 28 °C pendant 3 jours avec un suivi quotidien. L'absence de croissance bactérienne témoigne de la réussite de la stérilisation.

## **2.3. Ecrasement des nodules**

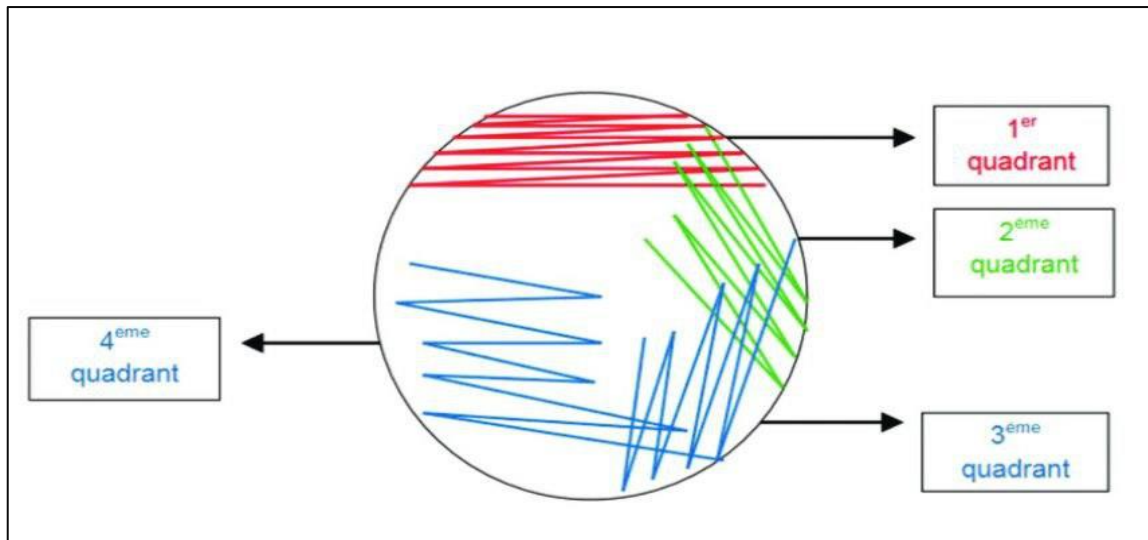
Dans des conditions d'asepsie totale, sous une hotte à flux laminaire, les nodules stériles sont placés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile déposée sur une boîte de Pétri stérile. Ils sont ensuite écrasés à l'aide d'une pince préalablement stérilisée par immersion dans de l'éthanol absolu, puis flambée à la flamme d'un bec Bunsen (Vincent, 1970).

## **2.4. Isolement des souches à partir des nodules**

Le jus nodulaire, obtenu après l'écrasement des nodules, est prélevé à l'aide d'une anse de platine stérilisée à la flamme du bec Bunsen, puisensemencée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu spécifique YMA additionné du rouge Congo (Vincent, 1970 ; Annexe 01). L'ensemencement est réalisé selon la méthode des quatre cadrant (Figure 13), permettant l'obtention de colonies isolées, facilitant ainsi leur identification. Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C pendant 3 jours.

Le reste du liquide extrait des nodules estensemencé dans un bouillon YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe 01), puis incubé à 28 °C durant 24 heures.

Cette procédure est répétée avec plusieurs nodules afin d'isoler un maximum de souches bactériennes.



**Figure 13 :** Ensemencement par la technique des quatre cadrans

## 2.5. Purification des bactéries

Pour chaque échantillon, une colonie bien isolée et représentative parmi les colonies présentant une morphologie similaire a été sélectionnée, puis repiquée plusieurs fois sur le milieu YMA+RC pour commencer le processus de purification.

Après chaque repiquage, une coloration de Gram a été réalisée. Cette démarche avait pour objectif de vérifier la pureté des isolats bactériens et, si nécessaire, de les purifier jusqu'à l'obtention de colonies parfaitement pures.

## 3. Caractères morphologiques et cultureux

### 3.1. Différents milieux de culture utiliser

Des milieux de culture spécifiques ont été utilisés pour l'isolement et la culture des bactéries rhizobiennes, chacun formulé pour fournir les nutriments nécessaires à leur développement. Les détails de leur composition (g/L d'eau distillée) présentée en Annexe 01.

Les milieux préparés sont :

YMB : Yeast Mannitol Broth.

YMA : milieu solide équivalent au YMB avec ajout d'agar.

YMA + RC : YMA additionné de rouge Congo.

YMA + BTB : YMA additionné de bleu de Bromothymol.

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

### 3.2. Examen microscopique des bactéries

L'examen microscopique après la coloration de Gram repose sur une technique à fort pouvoir discriminant, exploitant les caractéristiques biochimiques de la paroi cellulaire des bactéries. Cette méthode permet de classer les bactéries en deux grands groupes : les Gram positifs et les Gram négatifs.

L'analyse a été réalisée à partir de frottis préparés sur des lames propres, en étalant une fine couche de culture bactérienne issue du milieu YMA+RC. La manipulation se fait sous hotte à flux laminaire afin d'assurer des conditions stériles. La coloration de Gram a ensuite été appliquée selon la méthode classique décrite par Tortora (2003)

1. Fixation : le frottis est fixé par la chaleur, assurant l'adhérence et la conservation des cellules sur la lame.
2. Coloration primaire : les cellules sont colorées avec du violet de Gentiane pendant une minute.
3. Mordançage : l'ajout de lugol permet la formation d'un complexe violet-iodo insoluble dans les cellules.
4. Décoloration : une brève application d'un mélange alcool-acétone (10 à 15 secondes) différencie les bactéries selon la perméabilité de leur paroi. Les Gram positives conservent la teinte violette, tandis que les Gram négatives se décolorent.
5. Contre-coloration : une solution de fuch sine ou de safranine est appliquée pendant une minute, permettant de recolorer les Gram négatif en rose, les Gram positif conservant leur teinte initiale.

Après rinçage et séchage sans frottement, les lames sont observées au microscope optique à immersion (objectif  $\times 100$ ), ce qui permet d'analyser la morphologie bactérienne et de différencier clairement les deux groupes.

### 3.3. Conservation des isolats

La conservation des isolats se fait sur un milieu YMA additionné de 3 g/L de  $\text{CaCO}_3$  (Carbonates de Calcium), utilisé comme agent neutralisant de l'acidité. Ce milieu est distribué dans des tubes à essai sous forme de gélose inclinée. À partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, des stries régulières sont réalisées à la surface de la gélose. Après incubation à 28 °C pendant 3 jours les tubes sont stockés au réfrigérateur à 4 °C. Cette méthode permet de conserver les isolats pendant une période de 6 à 12 mois.

### 3.4. Test au bleu de Bromothymol ( vitesse de croissance)

Ce test permet d'évaluer la vitesse de croissance des isolats bactériens ainsi que leur aptitude à modifier le pH du milieu. Les isolats sont cultivés sur un milieu YMA +BTB, un indicateur de pH dont la couleur est verte à pH 6,8. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28 °C pendant une période de cinq jours, avec une lecture quotidienne afin de suivre l'évolution de la coloration du milieu.

### 3.5. Test de mobilité

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, un échantillon de la suspension bactérienne âgée de 24 heures est prélevé. Une piqûre centrale est ensuite réalisée dans un tube contenant le milieu de mannitol mobilité . Le tube est incubé à 28 °C pendant 72 heures.

L'observation d'une diffusion de la culture bactérienne dans le milieu traduit une mobilité, tandis qu'une croissance limitée au point d'inoculation témoigne une absence de déplacement.

Le passage de la couleur rouge au jaune dans le milieu indique une fermentation du mannitol.

## 4. Caractères phénotypiques

### 4.1. Tests biochimiques

Les bactéries nodulant les légumineuses synthétisent certaines enzymes jouent un rôle fondamental lors des différents stades de la symbiose, telles que la nitrate réductase, l'uréase, la cellulase et la pectinase.

#### 4.1.1. Réduction des nitrates

Pour détecter l'activité de la nitrate réductase, on utilise un milieu liquide TY (Annexe 01) contenant du nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ) à 0,1 % comme source d'azote. Après quatre jours d'incubation, on ajoute quelques gouttes de deux réactifs :

Réactif I : acide sulfanilique à 3 % dans de l'acide dilué à 25 %,

Réactif II :  $\alpha$ -naphtylamine à 0,5 % dans le même acide dilué.

-Si le milieu devient rouge, cela signifie que les nitrates ont été réduits en nitrites (résultat positif).

- Si aucune couleur n'apparaît, on ajoute de la poudre de zinc.

- Si le rouge apparaît après le zinc, cela indique que les nitrates n'ont pas été réduits (résultat négatif) ; et la couleur rouge au rose indique que les nitrates ont été réduits en nitrites sous l'action du zinc, la réaction est donc négative.
- Si le milieu reste incolore, cela signifie que les nitrates ont été complètement réduits en azote gazeux  $N_2$  (Delarras, 2007).

#### 4.1.2. Hydrolyse de l'urée

La détection de l'activité uréasique a été réalisée sur un milieu YMA supplémenté avec 20 % (p/v) d'urée et 0,012 g/L de rouge de phénol comme indicateur de pH, selon la méthode décrite par Jarvis *et al.* (1977). La solution d'urée a été stérilisée par filtration (pore de 0,45  $\mu$ m) puis ajoutée au milieu de culture, préalablement stérilisé par autoclavage et maintenu à 45 °C. Les boîtes de Pétri inoculées ont été incubées pendant 48 heures à 28 °C.

L'activité uréasique a été évaluée en observant un changement de couleur du milieu : une couleur rose fuchsia indique une réaction positive, traduisant une alcalinisation du milieu, tandis qu'une coloration jaune signale une réaction négative et une acidification.

#### 4.1.3. Activité cellulolytique

La production de cellulase par les bactéries a été évaluée sur un milieu YMA supplémenté avec 0,25 % (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC). Après une incubation de cinq jours à 28 °C, les boîtes ont été soigneusement rincées à l'eau courante, puis recouvertes d'une solution de rouge Congo (RC) à 1 mg/ml et incubées à nouveau à 28 °C pendant 30 minutes. Ensuite, cette solution a été remplacée par une solution de NaCl 1M, laissée en contact pendant 30 minutes à température ambiante.

L'apparition d'un halo jaune-orangé autour des colonies indique l'activité endoglucanasique de la cellulase produite.

#### 4.1.4. Activité pectinolytique

Pour détecter l'activité polygalacturonasique (pectinolytique), les isolats bactériens ont été cultivés sur un milieu YMA modifié, dans lequel le mannitol a été remplacé par 0,1 % (p/v) d'inositol et supplémenté avec 0,2 % (p/v) de pectine (Na-polygalacturonate). Les cultures ont été incubées à 28 °C pendant 7 jours. Après incubation, les boîtes ont été

délicatement rincées à l'eau du robinet, puis colorées avec une solution de l'iode de lugol pendant 30 minutes (Torimiro *et al.*, 2019) .

L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une activité polygalacturonasique, tandis que son absence révèle l'inactivité pectinolytique.

#### **4.1.5. Recherche de la catalase**

On dépose une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$  à 10 volumes) sur une lame propre, puis on y ajoute, à l'aide d'une anse stérile, une petite quantité de culture bactérienne jeune.

La présence immédiate de bulles indique une réaction positive, témoignant de la production de catalase. En absence de bulles, le résultat est interprété comme négatif.

### **4.2. Tests physiologiques**

Le développement des rhizobiums dans le sol dépend de plusieurs facteurs abiotiques. Le pH, qu'il soit acide ou basique, peut influencer leur survie et leur efficacité. La température qui affecte leur croissance et leur activité métabolique. Ainsi que la salinité peut représenter une source de stress, limitant leur capacité à se développer et à interagir avec les plantes.

#### **4.2.1. Effet de la température**

Des isolats ont été cultivés sur le milieu YMA afin d'étudier l'influence de la température sur leur croissance. L'ensemencement a été réalisé par la méthode des stries simples à partir d'une suspension bactérienne standardisée à 0,5 selon l'échelle de McFarland. Les cultures ont ensuite été incubées à différentes températures : 4 °C, 28 °C (témoin), 37 °C et 42 °C. Un suivi quotidien des boîtes a été effectué pour mieux observer la croissance.

#### **4.2.2. Effet du pH**

Les isolats ont été cultivés dans un milieu YMB (Annexe 01) ajusté à différents pH : 4,0 ; 5,0 ; 6,8 (témoin) ; 8,0 et 10,0. Chaque tube a été inoculé avec 100 µL d'une suspension bactérienne standardisée à 0,5 selon l'échelle de McFarland. L'incubation a été réalisée à 28 °C, La croissance des isolats a été évaluée après 72 heures d'incubation, par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm, à l'aide du spectrophotomètre.

#### **4.2.3. Tolérance à l'NaCl**

Dans le but d'évaluer la tolérance des isolats aux conditions salines, le milieu YMA, additionné de NaCl à différentes concentrations (0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 % et 10 % p/v), a été ensemencé par une ose d'anse de platine, prélevée à partir d'une suspension bactérienne normalisée à 0,5 sur l'échelle de McFarland. L'incubation a été réalisée à 28 °C. Un suivi quotidien des boîtes a été effectué afin d'observer plus précisément la croissance.

# **Chapitre 3**

## **Résultats**

### **et discussion**



## 1. Isolement des rhizobiums à partir des nodules

### 1.1. Test de stérilisation des nodules

Aucune croissance bactérienne n'a été détectée sur le milieu après la période d'incubation, ce qui confirme un résultat négatif (Figure 14). Cela indique que le nodule a été correctement stérilisé en surface, sans contamination externe. Il peut donc être utilisé pour la suite des manipulations, et on peut affirmer que toute croissance bactérienne observée par la suite provient exclusivement de micro-organismes endophytes.



**Figure 14 :** Résultat du test de stérilisation des sur milieu YMA+RC

### 1.2. Purification des bactéries

À partir du jus nodulaire issus de différents nodules, treize isolats ont été isolés et purifiés. Ces isolats correspondent aux critères des rhizobiums définis par Vincent (1970) et Jordan (1984), notamment par leur faible absorption du rouge Congo. Ils ont été codés O.v1 à O.v8 et O.n1 à O.n5 (Tableau 3), puis soumis à une coloration de Gram pour confirmer la pureté des cultures.

**Tableau 3 :** Isolats utilisés dans cette étude

Code des souches	Souches	Plante hôte	Origine géographique
O.v1	Isolat	<i>Ononis viscosa</i>	Quatre chemins Constantine Algérie
O.v2	Isolat		
O.v3	Isolat		
O.v4	Isolat		
O.v5	Isolat		
O.v6	Isolat		
O.v7	Isolat		
O.v8	Isolat		
O.n1	Isolat	<i>Ononis natrix</i>	Zouaghi Constantine Algérie
O.n2	Isolat		
O.n3	Isolat		
O.n4	Isolat		
O.n5	Isolat		

## 2. Caractères morphologiques et cultureux

### 2.1. Examen macroscopique des colonies

#### 2.1.1. Croissance sur milieu YMA

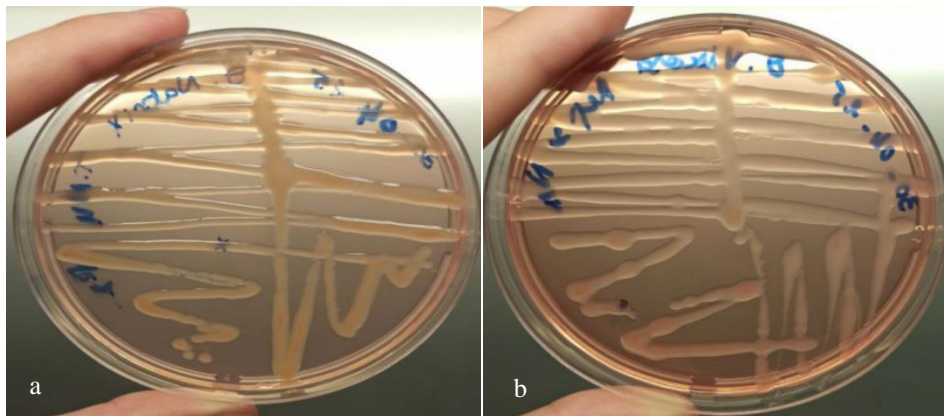
Après 48 heures d'incubation à 28 °C sur le milieu YMA , les colonies observées sur la boîte de Pétri présentent une forme majoritairement circulaire avec des contours réguliers, et un diamètre variant entre 2 et 5 mm (Jordan, 1984 ) . Elles sont de couleur blanche translucide, avec un aspect lisse, brillant et légèrement muqueux, suggérant la production d'exopolysaccharides (EPS). La croissance est uniformément répartie sur la surface du milieu, avec une visibilité claire des différentes zones d'inoculation (Figure 15).



**Figure 15 :** Croissances des isolats sur milieu YMA

### 2.1.2. Croissance sur milieu YMA+RC

Après une incubation de 48 heures, la croissance des isolats était nettement observable sur le milieu YMA+RC. Des colonies visqueuses, de teinte rose clair, ont été observées (Figure 16). Cette coloration rose clair constitue un indicateur important pour l'identification des souches de *Rhizobium*, et représente un critère essentiel pour la sélection des colonies à analyser, conformément aux critères établis par Vincent (1970). La capacité des contaminants à absorber le rouge Congo et à virer au rouge vif n'a pas été observée pour ces colonies, renforçant l'hypothèse de la présence de *Rhizobium*.



**Figure 16 :** Croissance des isolats sur milieu YMA+RC  
(a) : Aspect de l'isolat O.n4 , (b) : Aspect de l'isolat O.v7

### 2.1.3 Croissance sur milieu GPA + BCP

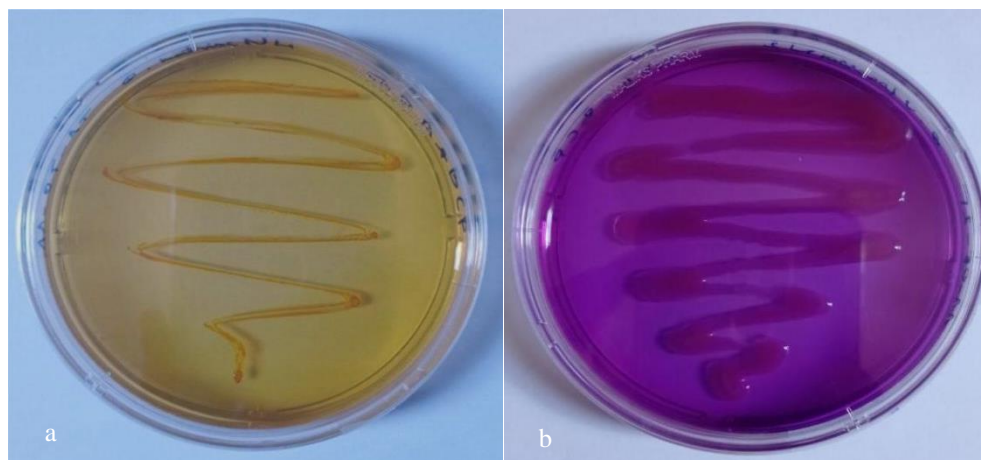
Le pourpre de Bromocrésol est un indicateur de pH couramment utilisé pour détecter les variations de pH dans le milieu GPA. En cas de croissance microbienne, un changement de couleur du milieu est observé : une coloration jaune indique une

acidification du milieu, tandis qu'une coloration violet foncé signale une alcalinisation.

Après incubation de 4 jours, une acidification du milieu GPA + BCP, traduite par un virage au jaune (Figure 17), a été observée chez 8 isolats (O.n2, O.n3, O.n4, O.n5, O.v1, O.v6, O.v7 et O.v8). Cela reflète leur capacité à utiliser le glucose contenu dans le milieu comme seule source de carbone. Ces résultats témoignent d'une activité métabolique significative sur ce milieu.

Ils sont en accord avec les travaux de Demissie *et al.* (2018) et de Küçük *et al.* (2006), qui ont montré que certaines espèces rhizobiens peuvent croître efficacement sur ce milieu, confirmant ainsi la capacité de *Rhizobium* à utiliser le glucose comme seule source de carbone.

À l'inverse, aucun virage de couleur (milieu restant violet) (Figure 17) n'a été observé chez les autres isolats, indiquant une absence de modification du pH. Cette absence d'acidification a également été observée par Benahmed (2010) suggérant un comportement métabolique similaire chez ses isolats. Des résultats comparables ont été rapportés par Torche (2006), qui a constaté une absence d'acidification dans des conditions expérimentales proches.

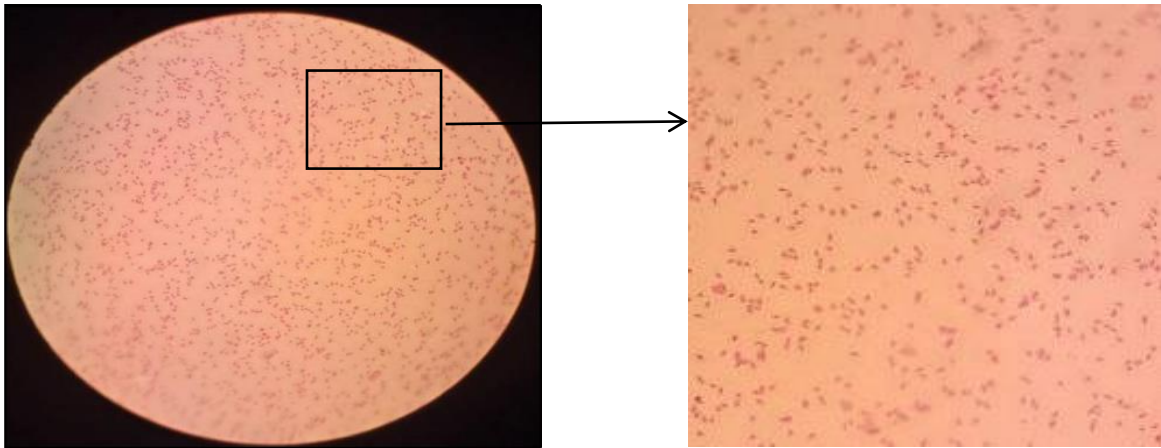


**Figure 17 :** Aspect macroscopique de la croissance des isolats sur GPA + BCP

(a) acidification du milieu GPA +BCP , (b) pas de changement de la couleur du milieu GPA+BCP

## 2.2. Examen microscopique des isolats

La coloration de Gram a montré que l'ensemble de nos isolats sont des bactéries en forme de bacilles, Gram négatif et asporulés (Figure 18). Ces observations correspondent aux caractéristiques typiques des rhizobia, qui sont décrits comme des bactéries du sol strictement aérobies, de forme bacillaire, Gram négatif et non sporulantes (Jordan, 1984). D'après les travaux de Jordan (1984) et Werner (1992), ces micro-organismes mesurent entre 0,6 et 0,9  $\mu\text{m}$  de large et entre 1,2 et 3  $\mu\text{m}$  de long.



**Figure 18 :** Observation microscopique de l'isolat O.n4.

### 2.3. Test de vitesse de croissance

Les rhizobiums sont classés en deux groupes selon leurs vitesse de croissance sur le milieu solide YMA. Selon Jordan (1984), le genre *Rhizobium* regroupe des bactéries à croissance rapide (colonies visibles en 3 à 5 jours) qui acidifient le milieu, tandis que *Bradyrhizobium* comprend des bactéries à croissance lente (7 à 10 jours), responsables d'une alcalinisation du milieu.

Dans notre étude, tous les isolats ont acidifié le milieu YMA+BTB (passage du vert au jaune) après 72 h d'incubation (Figure 19), indiquant une croissance rapide. Ces résultats concordent avec ceux de Menna *et al.*, (2006), qui ont observé que les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* provoquent une acidification, contrairement à *Bradyrhizobium*.



**Figure 19 :** Acidification du milieu YMA+BTB par les isolats

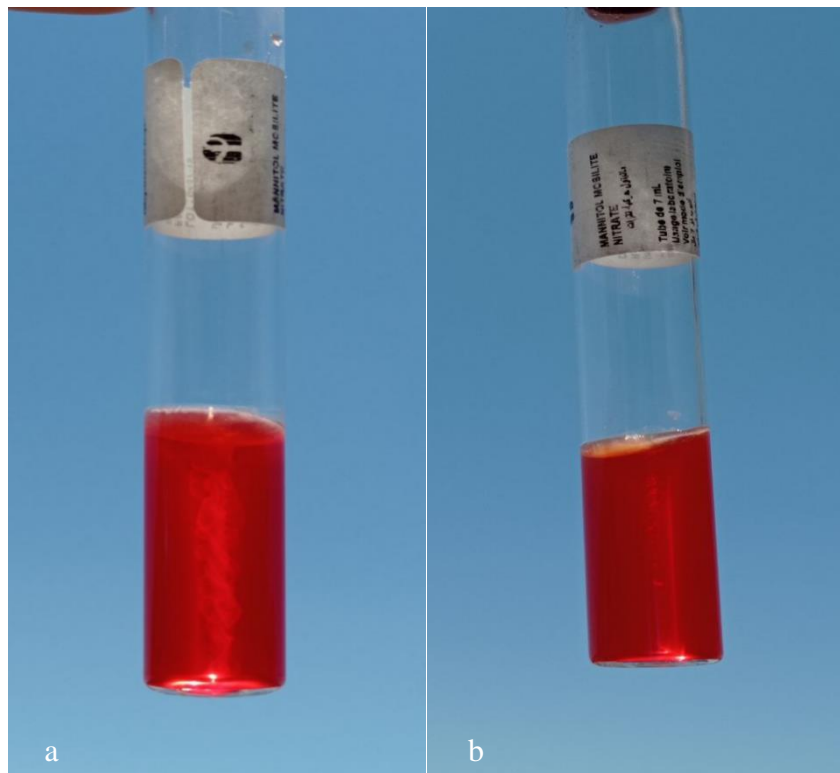
### 3.4. Test de mobilité

Des résultats positifs (mobilité +) ont été observés chez les isolats O.v2, O.v3, O.v6, O.v7, O.v8, O.n1, O.n2, O.n3, O.n4 et O.n5. Une diffusion d'un trouble homogène à partir du centre du milieu a été constatée dans ces tubes, indiquant la mobilité des bactéries (Figure 20 (a)).

De plus, un changement de couleur du milieu, passant du rouge à l'orangé, a été observé pour les isolats O.v2, O.v8, O.n2, O.n3 et O.n4. Ce changement témoigne d'une acidification du milieu, ce qui indique la fermentation du mannitol par ces isolats.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Chabbi (2010), ainsi que par ceux de Mouafek (2010) et Abdelhafid (2011) sur les bactéries nodulant la fève (*Vicia faba* L.) et la luzerne (*Medicago sativa* L.).

Par contre les isolats O.v1, O.v4 et O.v5 présentent une croissance restreinte à la piqûre centrale, ce qui suggère qu'ils sont immobiles (Figure 20 (b)).



**Figure 20 : Résultats du test de mobilité**

**(a) : Mobilité (+) , (b) : Mobilité (-)**

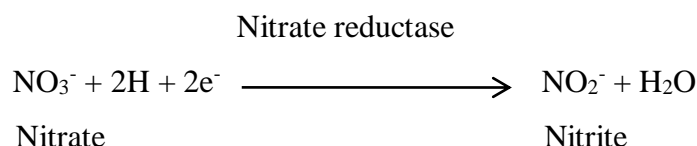
### 3. Caractères phénotypiques

#### 3.1. Tests biochimiques

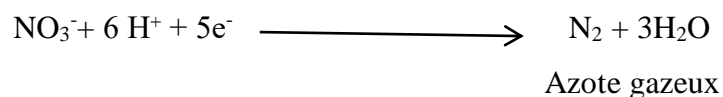
##### 3.1.1. Réduction des nitrates

Dans le sol, l'azote se trouve principalement sous forme d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) ainsi que sous forme d'oxydes d'azote, notamment les ions nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ). Parmi ces formes, les nitrates constituent la principale source d'azote assimilable pour la majorité des microorganismes et des plantes avec lesquelles ils interagissent.

Dans notre étude, après l'ajout de 2 à 3 gouttes des réactifs de nitrates réductase, onze isolats (O.v2, O.v3, O.v4, O.v5, O.v6, O.v8, O.n1, O.n2, O.n3, O.n4, O.n5) ont présenté une coloration rouge (Figure 20), indiquant la présence de l'enzyme nitrate réductase ( $\text{NR}^+$ ) et la réduction des nitrates en nitrites par la réaction suivant :

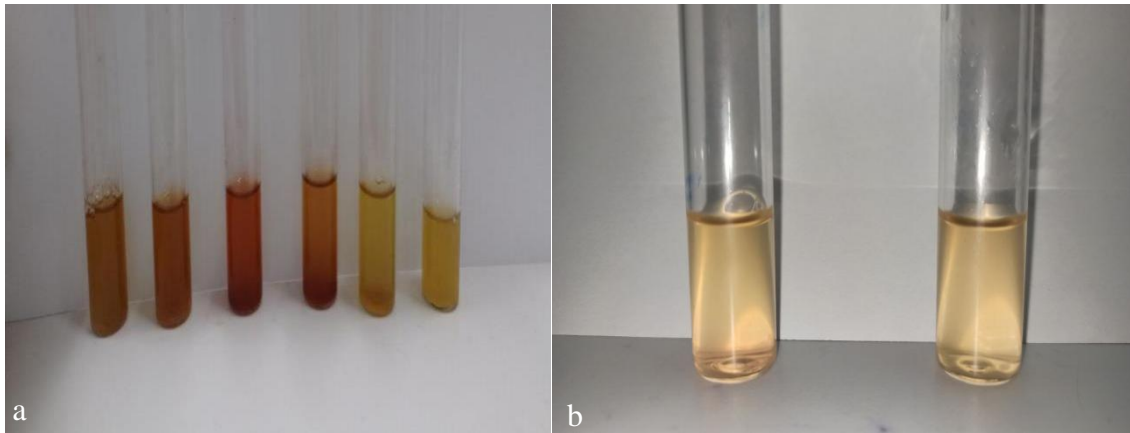


En revanche, les deux isolats restants (O.v1 et O.v7) n'ont montré aucun changement de couleur à cette étape. L'ajout ultérieur de poudre de zinc n'a entraîné aucune coloration (Figure 21 (b)), ce qui suggère que les nitrates ont été réduits au-delà des nitrites, jusqu'à l'azote gazeux selon la réaction suivant :



Ce phénomène correspond au processus de dénitrification.

Par ailleurs, Luciński *et al.* (2002) ont rapporté que les associations symbiotiques impliquant des souches de *Rhizobium* se caractérisent par une forte activité de la nitrate réductase.

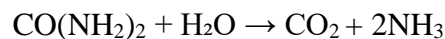


**Figure 21 :** Résultats du test de la réduction des nitrates

(a) Résultats après l'ajout des réactifs de nitrates , (b) Résultats après l'ajout du zinc.

### 3.1.2. Hydrolyse de l'urée

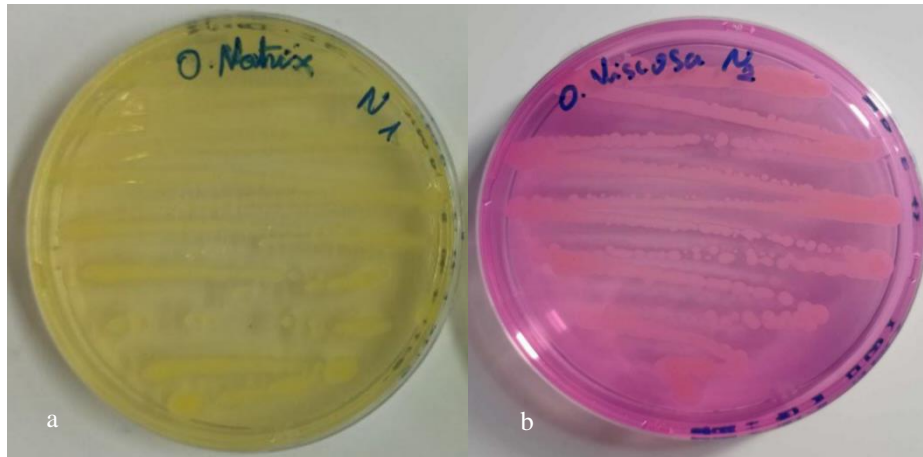
La capacité des rhizobiums à hydrolyser l'urée a été mise en évidence par les travaux de Jarvis *et al.* (1977). Dans notre étude, après incubation, un changement de couleur vers le rose fuchsia (Figure 22) a été observé chez onze isolats (O.v1, O.v2, O.v3, O.v4, O.v5, O.v7, O.v8, O.n2, O.n3, O.n4, O.n5). Cette coloration indique une alcalinisation du milieu, conséquence de la dégradation de l'urée en ammoniac, puis en ions ammonium, traduisant ainsi une activité uréasique selon la réaction enzymatique correspondante.



En revanche, aucun changement de pH n'a été noté chez les isolats O.v6 et O.n1 (Figure 22), ce qui suggère une absence d'activité uréasique, et donc une incapacité à hydrolyser l'urée.

Cette propriété bactérienne revêt une importance particulière. D'une part, elle joue un rôle clé dans l'assimilation des composés azotés présents dans l'environnement (Mobley, 1992). D'autre part, l'uréase constitue un mécanisme de défense et de survie, permettant aux bactéries de résister au stress acide rencontré dans divers environnements (Cotter et Hill, 2003).





**Figure 22 :** Résultats de l'hydrolyse de l'urée chez l'isolat O.v2 et O.n1  
**(a)** Uréase positif chez l'isolat O.v2 , **(b)** Uréase négatif chez l'isolat O.n1

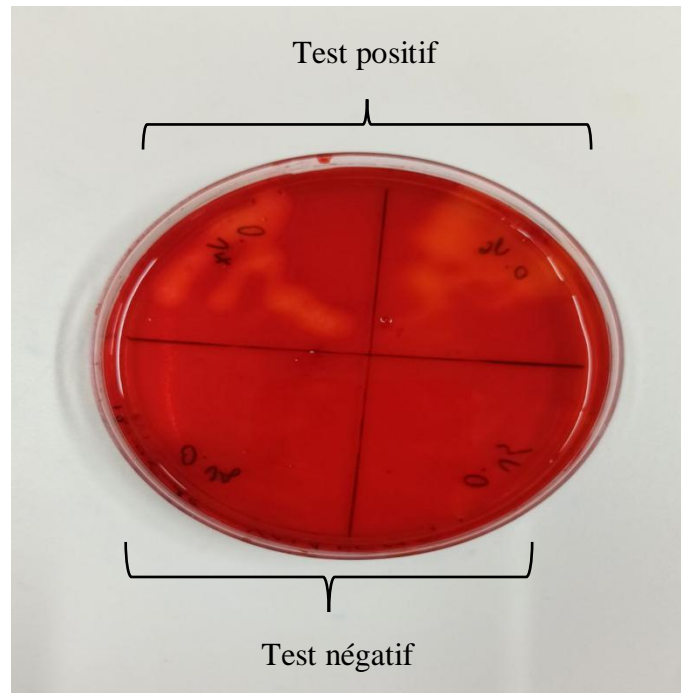
### 3.1.3. Activité cellulolytique

Ce test permet d'évaluer la capacité des bactéries à dégrader la cellulose, en révélant une activité cellulolytique. L'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies sur un fond rouge, observée chez les isolats O.v1, O.v2, O.v3, O.v4, O.v6 et O.v7 (Figure 23), témoigne d'une activité cellulolytique positive, attribuée à la présence d'endo- $\beta$ -1,4-glucanase. Cette activité enzymatique a été mise en évidence par l'hydrolyse du carboxyméthyl cellulose (CMC), selon Lindeström et Lehtomäki (1988).

En revanche, aucun halo n'a été observé chez les isolats O.v5, O.v8, O.n1, O.n2, O.n3, O.n4 et O.n5 , ce qui suggère une absence d'activité cellulolytique chez ces souches.

Selon José *et al.*, (2001), tous les microsymbiontes appartenant aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* présentent une activité cellulolytique. Toutefois, Benhizia (2006) rapporte que les bactéries isolées des nodules de légumineuses du genre *Hedysarum* ne manifestent pas cette capacité.

Ainsi, les résultats obtenus confirment la diversité fonctionnelle des isolats étudiés, notamment en ce qui concerne leur potentiel à produire des enzymes impliquées dans la dégradation de la paroi racinaire, un mécanisme crucial lors de l'établissement de la symbiose.

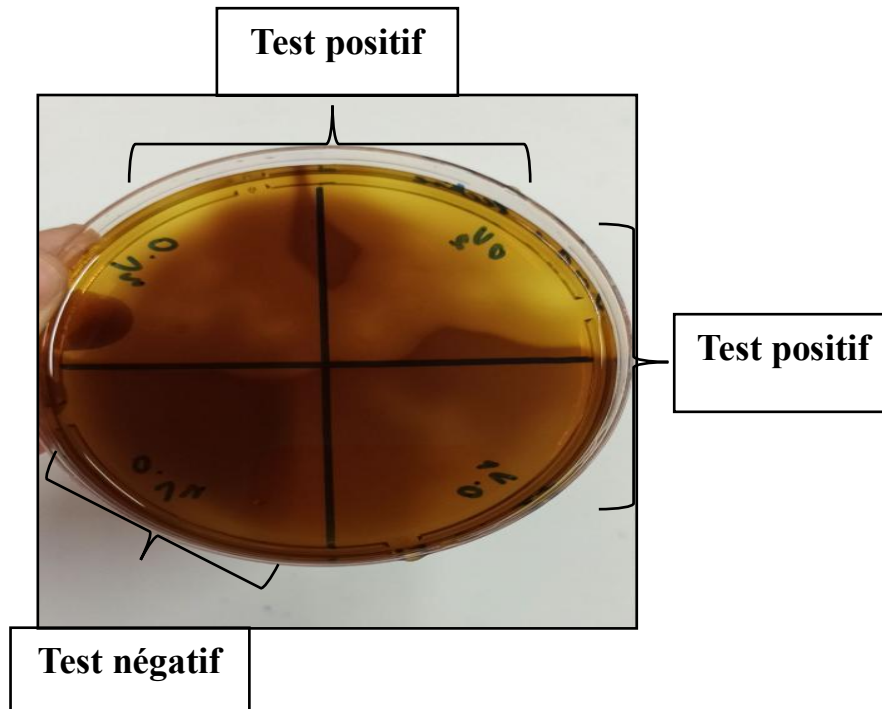


**Figure 23 :** Test de dégradation de la carboxyméthylcellulose (CMC) par des isolats bactériens

### 3.1.4 Activité pectinolytique

Lors de notre étude, nous avons évalué l'activité pectinolytique de plusieurs isolats bactériens en utilisant un test au Lugol. Après coloration puis rinçage, un halo clair est apparu autour des colonies des isolats O.v1, O.v2, O.v3, O.v6, O.v7 et O.n1, révélant leur capacité à dégrader la pectine. En revanche, aucun halo n'a été observé autour des autres isolats (Figure 24), suggérant une absence d'activité pectinolytique chez ces derniers.

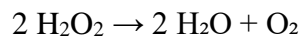
Cette activité enzymatique pourrait jouer un rôle clé dans le processus d'infection rhizobien, en facilitant la pénétration des poils absorbants par la dégradation localisée de la paroi cellulaire. En effet, selon Fähræus et Ljunggren (1959), l'induction de polygalacturonase dans les cellules racinaires par les rhizobiums pourrait constituer une étape précoce de l'infection, essentielle à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote.



**Figure 24 :** Résultats de la détection d'activité polygalacturonasique

### 3.1.5. Recherche de la catalase

Le test de catalase a été réalisé afin de détecter la présence de l'enzyme catalase, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



Cette réaction se manifeste visuellement par un dégagement de bulles d'oxygène lors du contact avec le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la formation de bulles indique une activité catalytique positive, tandis que leur absence traduit une activité négative.

Les résultats obtenus montrent que les isolats O.v1, O.v6, O.v8, O.n2, O.n3, O.n4 et O.n5 présentent une réaction positive, confirmée par la formation de bulles après l'ajout de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 25). Cela indique qu'ils produisent l'enzyme catalase et suggère qu'il s'agit probablement de souches aérobies strictes, ce qui est en accord avec les observations précédentes, notamment celles rapportées par Abdlhafid (2011).

En revanche, aucun dégagement gazeux n'a été observé pour les isolats O.v2, O.v3, O.v4, O.v5, O.v7 et O.n1, indiquant l'absence de catalase chez ces souches (Figure 25).



**Figure 25 :** Résultats du test de la catalase de l'isolat O.v4 et O.v1.

### 3.2. Tests physiologiques

#### 3.2.1. Effet de la température

La croissance optimale des rhizobiums s'observe à des températures comprises entre 28 °C et 31 °C (Graham, 1992). Néanmoins, plusieurs recherches ont mis en évidence leur capacité à résister à des températures plus élevées, en grande partie grâce aux protéines de choc thermique (HSPs), qui assurent une fonction essentielle dans la défense contre le stress thermique (Michiels *et al.*, 1994 ; Wallington et Lund, 1994).

Dans nos résultats (Tableau 4), tous les isolats montrent une croissance optimale à 28 °C. En effet, la majorité affiche une très bonne croissance (+++), généralement observable dès 48 heures, ce qui indique que cette température constitue des conditions idéales pour leur développement.

À 37 °C, la croissance reste généralement bonne (+++) pour quelques isolats, comme O.v2, O.n2, O.n3 et O.n4, tandis que d'autres (O.v6, O.v7) présentent une croissance modérée (++) observable après 4 jours. Cela suggère que, bien que cette température soit tolérée, elle est moins favorable que 28 °C pour certains isolats.

À 42 °C, la croissance est fortement réduite, et plusieurs isolats ne montrent aucun développement, notamment O.v6, O.v7, O.v8, O.n2 et O.n5. Cela met en évidence une sensibilité à la chaleur pour ces souches. En revanche, les isolats O.v2, O.n3, O.n4 présentent une très bonne croissance (+++), ce qui indique une tolérance thermique élevée, potentiellement liée à leur adaptation à des environnements chauds.

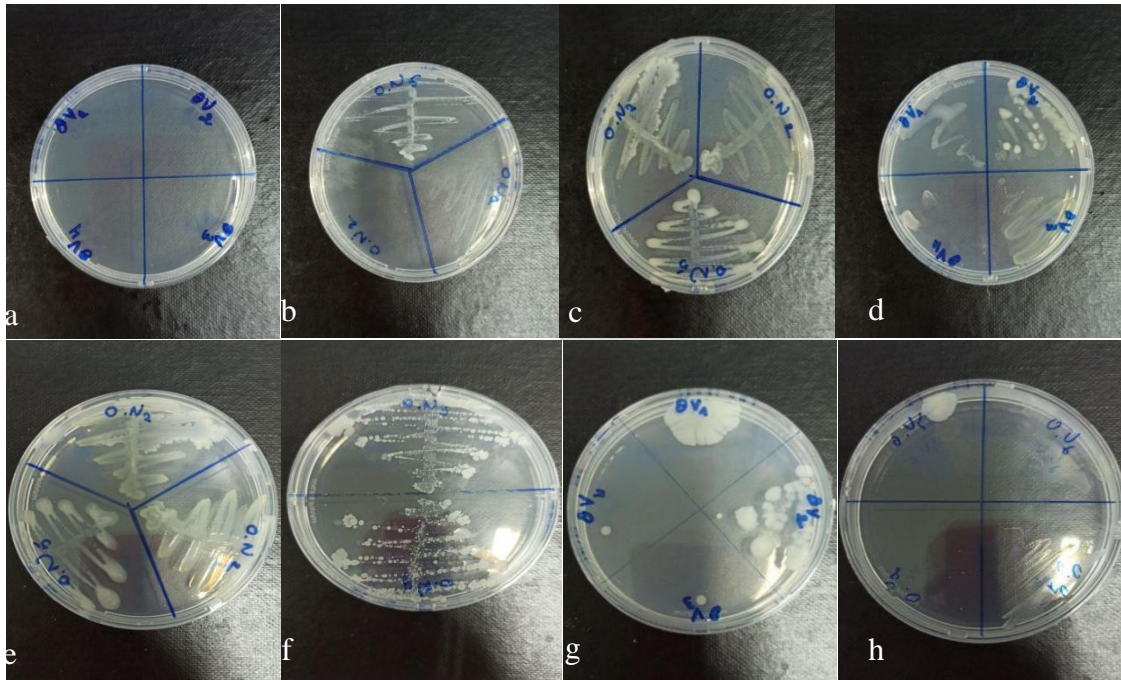
À 4 °C, la croissance est généralement absente chez la plupart des isolats, ce qui traduit une inhibition par le froid. Toutefois, certains isolats, tels que O.v1, O.v2, O.v3, O.v7, O.v8, O.n3 et O.n5, ont montré une croissance retardée (détectée entre 9 et 10 jours), indiquant une capacité à tolérer des températures basses, bien que dans des conditions de développement ralenti.

La chaleur excessive altère la différenciation des rhizobia en bactéroïdes et perturbe le fonctionnement des nodosités (Zahran, 1999). À l'inverse, les températures basses inhibent l'expression des gènes nod, ce qui compromet les processus d'infection et de formation des nodules (Zhang *et al.*, 1996). De plus, le froid constitue un facteur limitant majeur de la fixation de l'azote, notamment dans les régions humides ou soumises à de basses températures (Zhang et Smith, 1996).

**Tableau 4** : Observation de la croissance des isolats à différentes températures

	4 °C	28 °C	37 °C	42 °C
O.v1	+ (9 jrs)	+++ (48 h)	+ (48 h)	+ (72 h)
O.v2	+ (10 jrs)	+++ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (72 h)
O.v3	+ (10 jrs)	+++ (48 h)	+ (48 h)	+ (72 h)
O.v4	-	+++ (48 h)	+ (4 jrs)	+ (72 h)
O.v5	-	++ (48 h)	+ (48 h)	+ (72 h)
O.v6	-	+++ (48 h)	++ (4 jrs)	-
O.v7	+ (10 jrs)	+++ (48 h)	++ (4 jrs)	-
O.v8	++ (9 jrs)	++ (48 h)	-	-
O.n1	-	+++ (48 h)	+ (72 h)	+ (72 h)
O.n2	-	+++ (48 h)	+++ (72 h)	-
O.n3	+ (10 jrs)	+++ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (4 jrs)
O.n4	-	+++ (48 h)	+++ (72 h)	+++ (4 jrs)
O.n5	+++ (9 jrs)	+++ (48 h)	-	-

(+++): Très bonne croissance. (++) : Bonne croissance. (+) : Faible croissance (-): Absence de croissance (jrs) : jours  
(h) : heure.



**Figure 26 :** Croissance de certains isolats à températures différentes.

(a) et (b) isolats O. v1,O. v2,O. v3,O. v4,O. n1,O.n2 et O.n5 cultivé à 4°C , (c) et (d) isolats O. v1,O. v2,O. v3,O. v4,O. n1,O. n2 et O. n5 cultivé à 28°C , (e) et (f) isolats O.n1,O.n2,O.n3,O.n4 et O.n5 cultivé à 37°C , (g) et (h) isolats O.v1,O.v2,O.v3,O.v4,O.v5,O.v6,O.v7 et O.v8 cultivé à 42°C.

### 3.2.2. Effet du pH

L'acidité du sol constitue un facteur clé influençant la croissance et la survie des rhizobiums. Selon Keyser et Munns (1979), la croissance de ces bactéries est optimale dans une intervalle de pH comprise entre 4 et 6 (Hatimi *et al.*, 2013). Pour sa part, Jordan (1984) a montré que certaines espèces de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer un pH allant de 4,5 à 9,0. Il a notamment mis en évidence leur aptitude à noduler *Banara brasiliensis*, une légumineuse qui croît dans des sols dont le pH varie entre 4,0 et 6,0, ainsi que *Banara tropica*, qui prospère dans des sols à pH supérieur à 5,0 (Boddey, 2003).

L'analyse de la densité optique (DO) des isolats cultivés à différents pH met en évidence une variation marquée de leur croissance selon les conditions d'acidité ou d'alcalinité du milieu (Figure 27). Globalement, tous les isolats étudiés ont montré une capacité à se développer dans une large intervalle de pH, allant de 4 à 10, ce qui traduit une bonne tolérance aux variations du pH du sol.

Cependant, le pH optimal de croissance varie d'un isolat à un autre. Par exemple :

.O.v1 présente une croissance maximale à pH 8 et pH 10.

.O.v2 montre une bonne croissance à pH 10.

.O.v3 présente une croissance modérée dans toutes les conditions testées, avec un léger maximum à pH 10. Sa croissance reste relativement stable entre pH 5 et 8, indiquant une bonne tolérance, bien qu'aucun pic net ne soit observé. En revanche, sa croissance est plus faible à pH 4, suggérant une sensibilité aux fortes acidités.

.O.v8 atteint un pic de croissance à pH 10, suggérant une préférence nette pour des milieux alcalins, voire un caractère alcalophile.

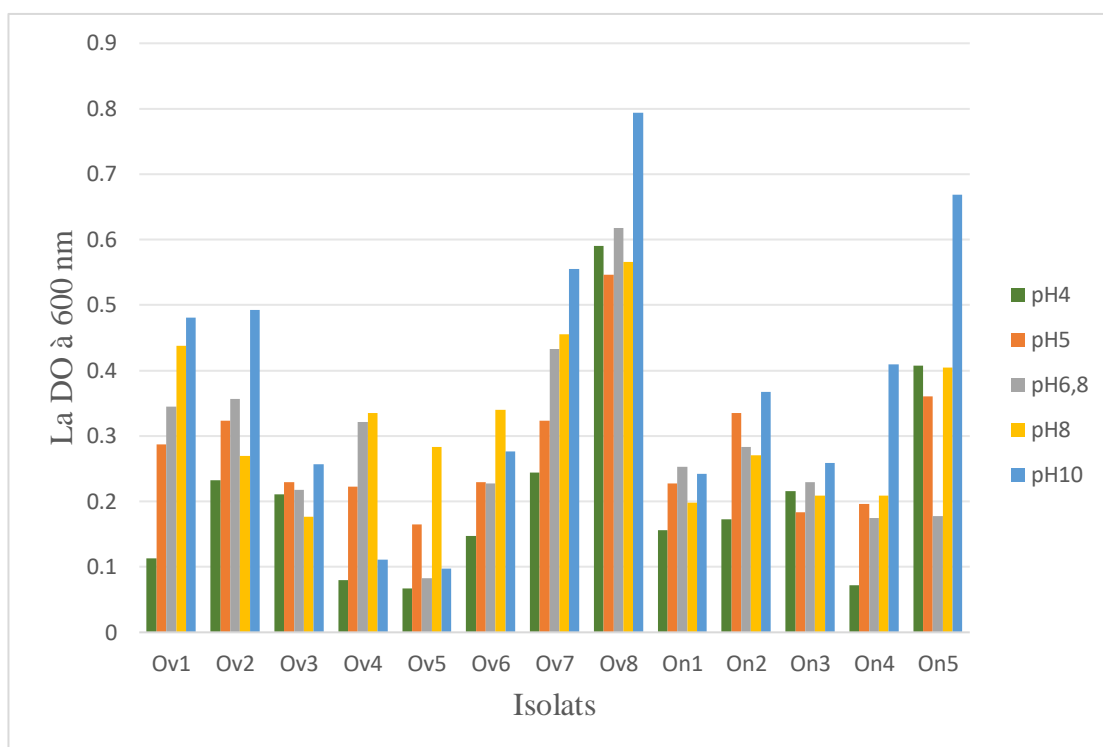
.O.n5 présente également une croissance élevée à pH 10.

À l'inverse, certains isolats, tels que O.v4, O.v5, O.v6, O.n1, O.n2, O.n3 et O.n4, présentent une croissance nettement réduite à pH 4 ou pH 5. Cela peut indiquer une certaine sensibilité aux milieux acides, pouvant limiter leur efficacité en conditions de sols acides.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Jordan (1984), qui a mis en évidence que les rhizobia peuvent tolérer un large intervalle de pH, généralement de 4,5 à 9,0 et que l'acidité du sol constitue une contrainte plus importante que l'alcalinité pour leur survie. En effet, un pH acide nuit à l'adhésion des bactéries aux poils racinaires, perturbant ainsi l'établissement de la symbiose (Chaker, 2015).

Enfin, les isolats O.v1, O.v2, O.v7, O.v8, O.n1 et O.n5 semblent bien adaptés à des conditions allant de pH neutre à alcalin (pH 6,8 à 10). Ces résultats confirment également les travaux de Graham (1992), selon lesquels les rhizobia à croissance rapide sont souvent plus sensibles aux conditions acides que ceux à croissance lente.





**Figure 27:** Effet du pH sur la croissance des isolats

### 3.2.3. Tolérance à l' NaCl

Merabet *et al.* (2006) ont démontré *in vitro* que certains rhizobiums isolés de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha*, prélevés dans la sebkha de Misserghine (Oran), étaient capables de tolérer une salinité allant jusqu'à 800 mM de NaCl. Par ailleurs, la symbiose entre les rhizobia et les légumineuses, ainsi que la formation des nodules racinaires chez les plantes hôtes, se révèlent plus sensibles au stress osmotique que les rhizobia eux-mêmes. La salinité compromet la fixation symbiotique de l'azote en réduisant la diffusion de l'oxygène dans les nodules, ce qui entraîne une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Zahran, 1999 ; Saadallah *et al.*, 2001).

La majorité des isolats tolèrent des concentrations de NaCl de 0,5 % jusqu'à 3 % avec une très bonne croissance (+++), généralement observée après 72 heures d'incubation (Tableau 5). Par exemple, les isolats O.v1, O.v2, O.v3, O.v6, O.v7, O.n1, O.n2, O.n5 montrent une très bonne croissance à 0,5 % et 1 % de NaCl après 72 heures. L'isolat O.v8 maintient une très bonne croissance jusqu'à 2 % de NaCl, avec un temps de croissance plus rapide, observé dès 48 heures. Les isolats O.n3 et O.n4 montrent une très bonne croissance même à 3 % de NaCl, mais après une incubation prolongée de 4 jours, indiquant une adaptation plus élevée à la salinité.



À partir d'une concentration de 3 % de NaCl, la croissance devient plus variable selon les isolats. Plusieurs d'entre eux, tels que O.v1, O.v3, O.v4, O.v5, O.v6, O.v7, O.n1 et O.n2, montrent une absence totale de croissance à 5 % de NaCl, même après plusieurs jours d'incubation.

En revanche, certains isolats conservent une certaine capacité à croître à 5 % :

O.v2 : faible croissance (+) après 48 heures,

O.v8 : bonne croissance (++) après 48 heures,

O.n3 et O.n4 : bonne croissance (++) après 48 heures,

O.n5 : faible croissance (+) après 72 heures.

Lorsqu'on augmente la concentration à 10 % de NaCl, seuls quelques isolats démontrent une tolérance :

O.v2 : faible croissance (+) après 72 heures,

O.n3 et O.n4 : faible croissance (+) après 48 heures.

Ainsi, les isolats O.n3 et O.n4 se distinguent par une très bonne croissance jusqu'à 3 %, une bonne croissance à 5 %, et une croissance faible à 10 %, indiquant une excellente tolérance au sel et suggérant un caractère halotolérant.

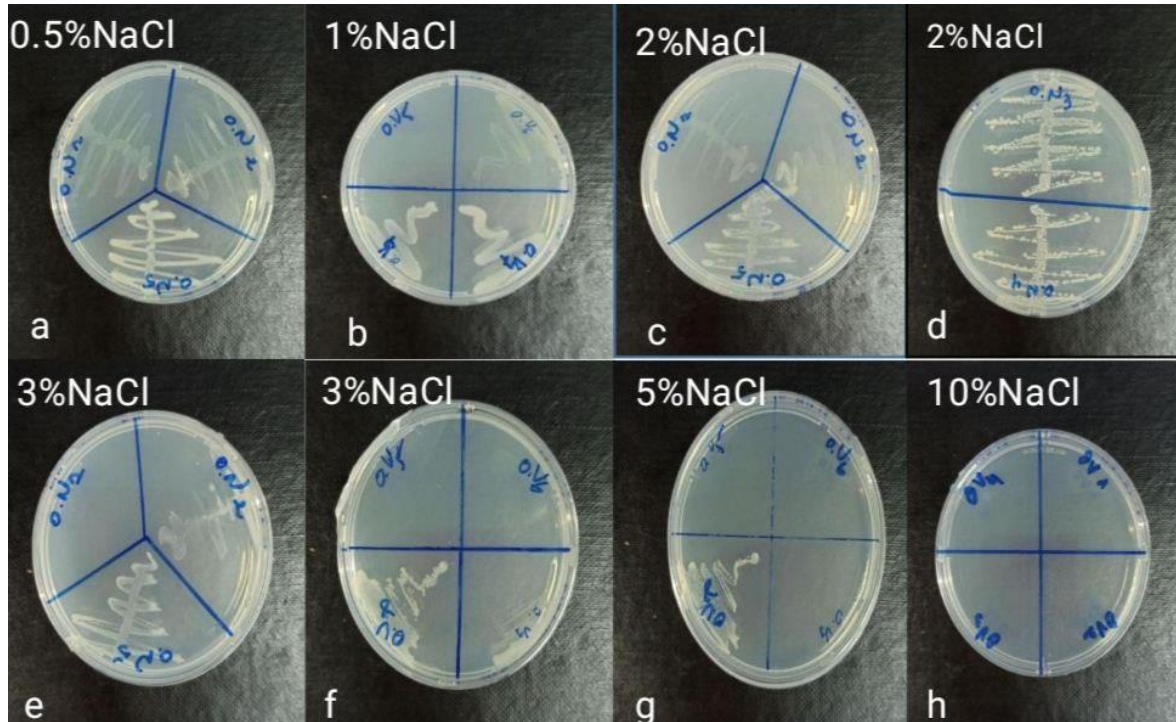
De même, O.v2 conserve une faible croissance même à 10 %, ce qui reflète une bonne capacité d'adaptation au stress salin.

En revanche, O.v5 est particulièrement sensible au sel, ne montrant aucune croissance à toutes les concentrations testées.

**Tableau 5 :** Observation de la croissance des isolats à différentes concentration de l'NaCl

	0.5%NaCl	1%NaCl	2%NaCl	3%NaCl	5%NaCl	10%NaCl
O.v1	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (72 h)	-	-	-
O.v2	+++ (4 jrs)	+++ (72 h)	+++ (4jrs)	++ (48 h)	+(48 h)	+(72 h)
O.v3	+++ (4 jrs)	+++ (72 h)	++ (72 h)	++ (4 jrs)	-	-
O.v4	++ (4 jrs)	-	-	-	-	-
O.v5	-	-	-	-	-	-
O.v6	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (4 jrs)	+(4 jrs)	-	-
O.v7	+++ (48 h)	+++ (48 h)	+++ (48 h)	++ (48 h)	-	-
O.v8	++ (48 h)	++ (4 jrs)	++ (48 h)	++ (48 h)	++ (48 h)	-
O.n1	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (4 jrs)	+(72 h)	-	-
O.n2	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (72 h)	++ (48 h)	-	-
O.n3	+++ (4 jours)	+++ (4 jrs)	+++ (4 jrs)	+++ (4 jrs)	++ (48 h)	+(48 h)
O.n4	+++ (4 jours)	+++ (4 jrs)	+++ (4 jrs)	+++ (4 jrs)	++ (48 h)	+(48 h)
O.n5	+++ (72 h)	+++ (72 h)	++ (48 h)	++ (48 h)	+(72 h)	-

(+++): Très bonne croissance. (++) : Bonne croissance. (+) : Faible croissance (-): Absence de croissance (jrs) : jours  
(h) : heure.



**Figure 28** : Croissance de certains Isolats à différentes concentrations d'NaCl

(a) isolats O. n1,O.n2,O. n5, cultivé à 0.5% NaCl, (b) isolats O. v5,O. v6,O. v7,O. v8 cultivé à 1% NaCl (c) et (d) isolats O.n1,O.n2,O.n3,O.n4,O.n5 cultivé à 2% NaCl , (e) et (f) isolats O.n1,O.n2 , O.n5,O.v5,O.v6,O.v7,O.v8 cultivé à 3% NaCl , (g) isolats O.v5,O.v6,O.v7,O.v8 cultivé à 5% NaCl , (h) isolats O.v1,O.v2,O.v3.O.v4 cultivé à 10% NaCl.

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux rapportés par Struffi *et al.* (1998), mettant en évidence une similitude dans le comportement des souches étudiées. De plus, il convient de noter que des variations dans la tolérance aux sels avaient déjà été observées chez la majorité des souches de *Rhizobium*, comme le soulignent Raza *et al.* (2001), ce qui confirme la diversité physiologique au sein de ce genre bactérien.

# **Conclusion et perspectives**

Avec l'intérêt croissant pour les pratiques agricoles durables, l'étude des bactéries symbiotiques associées aux légumineuses suscite un intérêt particulier, notamment pour mieux comprendre leurs interactions dans leur environnement naturel. Il est essentiel d'identifier les différentes formes de leurs microsymbiotes et de pouvoir les caractériser en laboratoire.

Dans cette étude, nous avons réalisé une caractérisation des bactéries associées à deux espèces du genre *Ononis* L. (*Ononis viscosa* et *Ononis natrix*), collectées dans la région de Constantine, Algérie. L'isolement et la caractérisation des souches ont été effectués selon les méthodes classiques spécifiques aux rhizobia, telles que décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994), ainsi que Jordan (1984). Cette approche nous a permis de constituer une collection de souches isolées à partir des nodules racinaires de ces légumineuses.

Les treize isolats sélectionnés ont présenté des caractères cultureux variables selon les milieux de culture utilisés. Sur le milieu YMA, ils ont formé des colonies lisses, muqueuses et blanches, avec une faible absorption du rouge Congo sur le milieu YMA additionné de ce colorant. Une croissance rapide a également été observée sur le milieu YMA supplémenté en BTB. Certains isolats induisent une modification du pH du milieu GPA+BCP en raison de leur capacité à métaboliser le glucose.

L'observation microscopique a révélé que les cellules bactériennes de ces isolats présentent une morphologie de bacilles courts, à coloration de Gram négatif.

Le test de mannitol mobilité confirme que la majorité des isolats sont mobiles

L'analyse phénotypique a également été complétée par divers tests biochimiques et physiologiques.

La majorité des isolats possèdent les enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'urée, à la dégradation de la cellulose ainsi qu'à celle de la pectine, contribuant au maintien de leur état physiologique fonctionnel. Par ailleurs, la plupart des souches présentent une activité positive de la nitrate-réductase, tandis qu'une majorité manifeste également une activité catalase positive.

Les isolats présentent une diversité physiologique marquée. Certains d'entre eux parviennent à se développer à des températures extrêmes, allant de 4 °C jusqu'à 42 °C.

Tous les isolats étudiés sont capables de croître dans un large intervalle de pH (de 4 à 10), avec une préférence notable pour des conditions neutres à légèrement alcalines. Concernant la salinité, la plupart supportent des concentrations allant jusqu'à 3 % de NaCl, tandis que quelques isolats, en particulier O.n3 et O.n4, conservent une croissance à 5 % et même 10 %, traduisant une tolérance élevée au sel. Ces observations reflètent la capacité de résistance de certaines souches aux conditions environnementales très variées.

Il serait intéressant d'élargir l'étude à différents sites géographiques afin d'enrichir les données disponibles sur les deux espèces *Ononis viscosa* et *Ononis natrix* et leurs populations locales.

Une identification moléculaire approfondie, incluant le séquençage du gène 16S rRNA ainsi que de gènes housekeeping (recA, atpD, glnII) ou du génome entier, est nécessaire pour confirmer l'identité de nos isolats. Ces analyses pourraient révéler l'existence d'une nouvelle espèce, contribuant à la taxonomie des rhizobiums associés au genre *Ononis* L. et ouvrant des perspectives pour le développement d'inoculant adaptés à l'agriculture durable.

Ainsi le recours à des techniques plus avancées telles que la métagénomique est nécessaire pour mettre en évidence les rhizobiums viables non cultivables associées à cette plante.

# **Références bibliographiques**

**-A-**

**-Abdlhafid L. (2011).** Effet de certains indicateurs de gènes nod (composés phénoliques) sur la croissance de *Rhizobium* en symbiose avec *Vicia faba* : caractérisation et lutte biologique. Thèse de Doctorat ès Sciences : Biologie moléculaire et cellulaire. Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen, 43 p. Cité par Gaci M. (2021). Identification des rhizobiums indigènes piégés à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L. en Algérie, par approche polyphasique. Thèse de Doctorat en Sciences : Écologie Microbienne. Université Frères Mentouri Constantine 1.

**-Andrews M. and Adrews M. E. (2017).** Specificity in legume-Rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 1(705), p : 1-39. Cité dans Boukaous L. (2020). Mise en évidence des Bactéries Nodulant les Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de l'Algérie. Thèse de doctorat : Écologie microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri, 80 p.

**-B-**

**-Basu S. and Kumar G. (2020).** Nitrogen fixation in a legume-rhizobium symbiosis: The roots of a success story. Dans : Varma A., Tripathi S. and Prasad R. *Plant Microbe Symbiosis*. Cham : Springer International Publishing. Cité dans Gaci M. (2021). Identification des rhizobiums indigènes piégés à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L. en Algérie, par approche polyphasique. Thèse de doctorat : Écologie Microbienne. Université Frères Mentouri Constantine.

**-Beck D.P., Materon L.A et Afandi F. (1993).** *Rhizobium*–Pratique végétale. Manuel technologique. Syrie : ICARDA, 290 p. Cité par Mazouz C. (2018). Caractérisation biochimique des bactéries nodulantes de la légumineuse *Trigonella foenum-graecum* L. Mémoire Master : Écologie microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

**-Bélanger E. (1998).** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium* sp. (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maitre des sciences. Université Laval.

**-Benahmed A. (2010).** Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium*. Mémoire de Magister: Microbiologie. Université Mentouri Constantine, p : 128.

**-Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. et squartini A. (2004).** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), p: 462-468.



- Benhizia Y. (2006).** Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum*(*H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf., et *H. pallidum* Desf.). Thèse de Doctorat d'État : Microbiologie appliquée. Université de Constantine, Algérie.
- Berger A. (2019).** Contribution des phytoglobines et des nitrate réductases à la régulation de l'oxyde nitrique et de la fixation de l'azote dans la symbiose *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de Doctorat : Interaction Moléculaires et cellulaires. Université Côte d'Azur.
- Beringer J. E. (1974).** R factor transfers in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84(1), p: 188-198.
- Brewin N. J., Downie J. A. et Young J. P. W. (1992).** Nodule formation legumes. Dans: Lederberg M. R. J. Encyclopedia of Microbiology. New York : Rockefeller University, p : 239–248.
- Brice F. (2011).** Les mots de la botanique. France : Actes sud.
- Boddey L. H. (2003).** Ocorrência e diversidade de bacterias diazotrófica do gênero *Burkholderia*, ispladas de cana-de-súcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil.DSc Tythesis, Univ. Federal Rural do Rio Janeiro, R J. Brasil.

#### -C-

- Chabbi R. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magistère : Microbiologie. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Chaker Haddadj A. (2015).** Évaluation de la tolérance à la contrainte saline chez quelques variétés de féverole (*Vicia faba* L. minor) cultivées en Algérie : aspects morphologiques, biochimiques, symbiotiques et agronomiques. Thèse de Doctorat : Sciences agronomiques. École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), El Harrach – Alger.
- Chammer W. (2014).** Caractérisation phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Astragalus mareoticus* (région Fontaine des Gazelles, Biskra). Mémoire Master 2: Microbiologie. Université Mohamed Khider Biskra, 34 p.
- Cotter P. D. et Hill C. (2003)** Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, sept 2003, p: 429 – 453.

**-Crespi M. and Galvez S. (2000).** Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), p: 155–166.

**-D-**

**-Delarras C. (2007).** Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne. dans : Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Paris : TEC & DOC, EM Inter, p : 126–172. Cité par Boukaous L. (2020). Mise en évidence des bactéries nodulant les légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de l'Algérie. Thèse de Doctorat : Écologie microbienne. Université Frères Mentouri Constantine 1.

**-Demissie N., Degefu T., Ergena A. et Ojiewo C. (2018).** Phenotypic characterisation of rhizobial and non-rhizobial isolates recovered from root nodules of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 12(4), p: 74–85.

**-Denarié J., Debellé F. and Promé J.C. (1996).** *Rhizobium* lipo-chitoooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), p : 503–535.

**-Dénarié J. (2000).** Texte de la 8<sup>ème</sup> conférence de l'université de tous les savoirs. Cité dans Mazouz C. (2018). Caractérisation biochimique des bactéries nodulants la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L. Memoire Master : Ecologie microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri.

**-de Lajudie P., Andrews M., Ardley J., Eardly B., Jumas-Bilak E., Kuzmanovic N., Lassalle F., Lindström K., Mhamdi R., Martínez-Romero E., Moulin L., Mousavi S. A., Nesme X., Peix A., Puławska J., Steenkamp E., Stępkowski T., Tian C. F., Vinuesa P., Wei G., Willems A., Zilli J. and Young P. (2019).**

Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(7), p: 2405–2413.

**-Doyle J. J. and Luckow M. A. (2003).** Therest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Biologie*, 131(3), 900-910.

**-Dupuy Y. et Nougier P. (2005).** Les microorganismes du gène à la biosphère. Paris : Ellipses, p : 256. Cité dans Mazouz C. (2018). Caractérisation biochimique des bactéries nodulants la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L. Memoire Master : Ecologie microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri.

**-E-**

**-Estrada-de los santos P., Palmer M., Chavez-Ramirez B., Beukes C., Steenkamp E. T., Briscoe L., Khan N., Maluk M., Lafos M., Humm E., Arrabit M., Crook M., Gross E., Simon M. F., Dos rios junior F. B., Whitman W. B., Shapiro N., Poole P. S., Hirsch A. M., Venter S.N. and James E. K. (2018).** Whole genome analyses suggests that burkholderia sensu lato contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov. and *Trnikia* gen. Nov.): implications for the evolution diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae. *Genes (Basel)*, 9, p: 389-412.

**-F-**

**-Fåhræus G. and Ljunggren H. (1959).** The possible significance of pectic enzymes in root hair infection by nodule bacteria. *Physiologia Plantarum*, 12, 145–154. Cité par Gaci M. (2021). Identification des rhizobiums indigènes piégés à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L. en Algérie, par approche polyphasique. Thèse de Doctorat en Sciences : Écologie Microbienne. Université Frères Mentouri Constantine 1.

**-Fernandez-Lopez M., Goormachtig S., Gao M., D'Haese W., Van Montagu M. and Holsters M. (1998).** Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), p: 12724–12728.

**-Foucher F. and Kondorosi E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology*, 43(5–6), p: 773–786.

**-Frank B. (1889).** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges*, 7, p: 332-346. Cité dans Boukaous L. (2020). Mise en évidence des Bactéries Nodulantes des Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de Thèse de doctorat : Écologie microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri, 80 p.

**-G-**

**-Graham P.H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, p: 475–484.

**-Gobat J.M., Aragno M., Ragot Matthey W. (2010).** Le sol vivant : bases de pédagogie des sols. Cité dans : Gobat J.M. (éd.). Le sol vivant : Bases de pédagogie des sols. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes (PPUR), p : 1–695.

**-Guldan S. J., Martin C. A., Cueto-wong J. and Steiner R. L. (1996).** Interseeding legumes into Chile: legume productivity and effect on Chile yield.

#### **-H-**

**-Hatimi A., Bani-Aameur F. et Oihabi A. (2013).** Caractérisation de souches de *Rhizobium* autochtones des dunes : effet sur la croissance et la nutrition azotée d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Acta Botanica Gallica*, 148(3), p: 191–199.

**-Hirsch A.M. (1992).** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122(2), p: 211–237.

#### **-J-**

**-Jarvis B. D. W., Robertson I. G. C. et Fanning G. R. (1977).** Phenetic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and rhizobium strains from agricultural plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(2), p: 235–248.

**-Jiang K., Pan B. and Tian B. (2019).** Recent taxonomic changes for Fabaceae (Leguminosae) genera in China. *Biodiversity Science*, 27(6), p: 689–697.

**-Jordan D. C. (1984).** *Rhizobiaceae*. dans: Kreig N. R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, p: 234–256.

**-José N., Arora D. K. et Sharma A. K. (2001).** Cellulolytic activity in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and its possible role in root hair infection. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), p: 219–227.

#### **-K-**

**-Kucuk C., Kivanc M. et Kinaci E. (2006).** Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from bean. *Turkish Journal of Biology*, 30(2), p: 127–132.

**-Kumar V., Kumar M., Sharma S. and Prasad R. (2017).** Probiotics and plant health (ebook). Singapor : Springer, p 53. Cité dans Bendaira Z. et Felten S. (2019). Carctérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Mémoire Master : Ecologie Microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri.

### -L-

- Lindström K. and Lehtomäki S. (1988)**. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galega) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 50, p: 277–287.
- Lindström K., Murwira M., Willems A. and Altier N. (2010)**. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161, p: 453–463.
- LPWG. (2017)**. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66 (1), p: 44–77.
- Lucinski R., Polcyn W. et Rotayczak L. (2002)**. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium leguminosae*. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2), p: 537–546.

### -M-

- Machrafi V. (2001)**. Inhibition de la symbiose *Rrhizobium*-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écroces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maitre des sciences. Université Laval.
- Margot et Roland Spohn (2009)**. 450 fleurs. Paris : Delachaux et Niestlé.
- Masson-Biovin C., Giraud E., Perret X. and Batut J. (2009)**. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol*, 17, p : 458-466. In : Domergue O, (2017). Diversité fonctionnelle de *rhizobia* associés à la féverole, en agro-écosystème Sud de France. Thèse de doctorat : Science de la terre et de l'atmosphère. Université de recherche Paris Sciences et Lettres,
- Maunoury N., Kondorosi A., Kondorosi E. and Mergaert P. (2008)**. Cell biology of nodule infection and development. dans: James E.K., Sprent J.I., Dilworth M.J. and Newton W.E. Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. New York : Springer-Verlag, 153–189. Cité dans Boukaous L. (2020). Mise en évidence des Bactéries Nodulantes des Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de Thèse de doctorat : Écologie microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri.
- Menna P., Hungria M., Barcellos F.G., Bangel E.V., Hess P.N. et Martinez-Romero E. (2006)**. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, p: 315–332.

**-Merabet C., Bekki A., Benrabah N., Bey M., Bouchentouf L., Ameziane H., Rezki M., Domergue O., Cleyet Marel J. C., Avarre J. C., Béna G., Bailly X., de Lajudie P. (2006).** Distribution of *Medicago* species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Management*, 20(3), p: 219–231.

**-Michiels J., Verreth C. and Vanderleyden J. (1994).** Effect of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* [en ligne], 60(4), 1206–1212, (page consulté le 4 avril 2025).

<https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aem.60.4.1206-1212.1994>

**-Mobley L.T.H. (1992).** Urease. dans: Lederberg J. *Encyclopedia of Microbiology*. San Diego : *Academic Press*, p : 327-346.

**-Mouafek A. (2010).** La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et la luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. Mémoire de Magister : Sciences Agronomiques. Université Mohamed Khider Biskra, p 6 et 37.

#### **-O-**

**-O'hara G. W., Zilli J. E., Poole P. S. and Hungria J. (2016).** Taxonomy and physiology of rhizobia. In: Howieson J. G. and Dilworth M. J. (eds.) *working with rhizobia*. Canberra: Australian center for international agricultural research, p: 125-144.

#### **-P-**

**-Patriarca E. J., Tate R., Ferraioli S. and Laccarino M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol*, p : 62-201. Cité dans Mazouz C. (2018). Caractérisation biochimique des bactéries nodulantes la légumineuse *Trigonella foenum-gracum* L. Mémoire Master : Ecologie microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri.

**-Perret X., Staehelin C. and Broughton WJ. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, p : 180–201.

**-Perry J., Staley J. et Lory S. (2004).** Microbiologie : cours et questions de révision. Paris : Dunod. p : 53. Cité dans Bendaïra Z. et Felten S. (2019). Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Mémoire Master : Ecologie Microbienne. Université Constantine 1 Frères Mentouri.

**-Poole P., Ramachandran V. and Terpolilli J. (2018).** Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol*, 16, p : 291-303.

**-Prodel M. (2022).** Noms dialectaux des végétaux de la Corrèze. (n.p.): *Books on Demand*. 156 p. cité dans Mellah Y. et Menoubi O. (2023). Analyse du caryotype de trois espèces du genre *Ononis* L. Mémoire Master : Biologie et physiologie de la reproduction . Université Constantine 1 Frères Mentouri, p5.

**-Q-**

**-Quezel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, 1(2). CNRS, Paris, France. Cité dans Mellah Y. et Menoubi O. (2023). Analyse du caryotype de trois espèces du genre *Ononis* L. Mémoire Master : Biologie et physiologie de la reproduction . Université Constantine 1 Frères Mentouri, p5.

**-R-**

**-Rasanen L. (2002).** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd. 220 p.

**-Raza S., Jornsgard N., Abou-Taleb B. H. and Christiansen J. L. (2001).** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, p : 12–19.

**-Roger P. (1996)** : La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement ? Conference debat de l'ORSTOM. Paris Xe France. Cité dans CHEMMAR W. (2014). Caractérisation phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Astragalus mareoticus* (région Fontaine des gazelles, Biskra). Thèse de Master : Biochimie et Biologie Moléculaire. Université Mohamed Khider Biskra.

**-S-**

**-Saadallah K., Drevon J. J. et Abdelly C. (2001).** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*, 21(6), p: 627–634.

**-Shamseldin A., Abdelkhalek A. and Sadowsky M. J. (2016).** Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating review. *Symbiosis*, 71(2), p: 91-109.

**-Shiraishi M., Tanaka N., and Watanabe T. (2010).** Nodulation of Robinia pseudoacacia by Pseudomonas spp. isolated from root nodules. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), p: 1321–1329.

- Somasegaran P. and Hoben H. (1985).** Methods in legume-Rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL Project, Paia, Hawaii.
- Somasegaran P. and Hoben H.J. (1994).** Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. New York: Springer-Verlag. 450 p. – (Springer Laboratory Manual).
- Spaink HP. (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, p: 257–288.
- Sprent J. (2009).** Legume Nodulation: A Global Perspective. Chichester: Wiley-Blackwell. P: 200.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S. and Nuti M. P. (1998).** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), p : 81–89.

-T-

- Torche A. (2006).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister : Microbiologie. Université Constantine 1 des Frères Mentouri , Algérie, 166 p.
- Torimiro N., Adediwura V.A., Ojo S.T., Oluwadare A.O. and Okonji R.E. (2019).** Pectinolytic activities of pectinase produced by some bacterial isolates cultured from deteriorating fruits. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 35(2), p: 91–98.
- Tortora GJ., Funk BR. et Case CL. (2003).** Introduction à la microbiologie. Eds du Renouveau Pédagogique Inc. p : 945. Cité par Ayadi A., Amireche R. (2017). Analyse phénotypique des isolats nodulant *Trigonella gladiata* Stev. Mémoire de Master : Écologie Microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- Tourte Y., Bordonneau M., Henry M. and Tourte C. (2005).** Le monde des végétaux : organisation, physiologie et génomique. Paris : Dunod. 320 p. Cité dans Dekan A. (2016). Caractérisation des souches bactériennes par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolées à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des *Ginseae* (*Fabaceae*). Thèse de doctorat : Biotechnologies Végétale. Université Frères Mentouri Constantine 1, p : 25.
- Turini F.G., Bräuchler C. and Heubl G. (2010).** Phylogenetic relationships and evolution of morphological characters in *Ononis* L. (*Fabaceae*). 59, p : 1077–1090. Cité dans Al-Zubaidy, A. M. A., Samin, N. W., Abdalla, S. R. & Abdulla, N. O. (2021).



Ecology and geographical distribution of *Ononis* L. spp. (*Fabaceae*) in Iraq. *Plant Archives*, 21(1), p : 1647–1653.

**-V-**

**-Vernie T. (2008).** Analyse fonctionnelle d'EFD, Un regulateur transcriptionnel de lanodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloci*, p : 125-145. Cité dans Dekak A. (2016). Caractérisation des souches bactériennes par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolées à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des *Ginseae* (*Fabaceae*). Thèse de doctorat : Biotechnologies Végétale. Université Frères Mentouri Constantine 1, p : 25.

**-Vincent J.M. (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd. 164 p. – (IBP Handbook, no. 15).

**-W-**

**-Wallington E.J. and Lund P.A. (1994).** *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (cpn60) genes. *Microbiology*, (140, 133–142). cité par Boukaous L. (2020). Mise en évidence des bactéries nodulant les légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de l'Algérie. Thèse de Doctorat : Ecologie microbienne. Université des Frères Mentouri – Constantine 1.

**-Werner D. (1992).** Symbiosis of plants and microbes. Marburg, Allemagne : Chapman and Hall. Université de Phillips. Cité dans BENDAIRA Z. et FELLEEN S. (2019). Caractérisation phénotypique des isolats nodulant la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Mémoire de Master : Écologie Microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine.

**-Z-**

**-Zahran H.H. (1999).** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [en ligne], 63 (4), (consulté le 02 avril 2025). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC98982/>

- Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C. and Gillis M. (2004).** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, (27), p: 380–395.
- Zhang F., Smith D.L. (1996).** Inoculation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and soil*, (179), p: 233–241.
- Zhang X., Harper R., Karsisto M. and Lindström K. (1991).** Diversity of Rhizobium bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), p : 104–113.

### Webographie

- Biofertilisants.fr.** Les bactéries fixatrices d’azote schéma de la fixation biologique de l’azote [en ligne]. (Consulté le 9 avril 2025). <https://web.archive.org/web/http://www.biofertilisants.fr/zoom-les-bacteries-fixatrices-dazote/>
- Dronnet Erick.** Belles Fleurs de France – *Ononis natrix* [en ligne]. (page consultée le 2 mai 2025). [http://erick.dronnet.free.fr/belles\\_fleurs\\_de\\_france/ononis\\_natrix.ht](http://erick.dronnet.free.fr/belles_fleurs_de_france/ononis_natrix.ht)
- Ekopédia (2015).** [en ligne]. (consulté le 4 avril 2025). <https://www.ekopedia.fr>.
- FloreAlpes.** FloreAlpes [en ligne] (page consultée le 2 mai 2025). [www.florealpes.com](http://www.florealpes.com)
- FloreAlpes.** *Ononis viscosa* subsp. subcordata [en ligne]. (consulté le 2 mai 2025). [https://www.florealpes.com/fiche\\_ononisviscosasubcord.php?liste=663&utm](https://www.florealpes.com/fiche_ononisviscosasubcord.php?liste=663&utm)
- Legume Data Portal.** Legume Data Portal [en ligne]. (page consultée le 4 avril 2025). <https://legumedata.org>.
- MNHN & OFB.** Inventaire national du patrimoine naturel (INPN) [en ligne]. (consulté le 2 mai 2025). <https://inpn.mnhn.fr>.
- Tela Botanica.** eFlore – *Ononis natrix* L. (synthèse) [en ligne]. (page consultée le 2 mai 2025). <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44839-synthese>
- Willemse France.** Bugrane jaune – *Ononis natrix* [en ligne]. (page consultée le 2 mai 2025). [https://www.willemsefrance.fr/collections/bugrane-jaune-ononis-natrix-lat?utm\\_](https://www.willemsefrance.fr/collections/bugrane-jaune-ononis-natrix-lat?utm_)

# **Annexes**

**Annexe 01****Milieux de culture et solution utilisés****Composition de milieux YMB(Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)**

Mannitol.....	10.00 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.50 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.20 g
NaCl.....	0.10 g
Extrait de levure.....	0.50 g
Eau distillée.....	1000 ml
PH .....	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

YMB.....	1000 ml
Agar.....	18 g
pH.....	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

**Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l**

YMB.....	1000 ml
Solution de Rouge Congo.....	10 ml
Agar.....	18g
pH.....	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

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

YMB.....1000 ml

Solution de BTB.....5 ml

Agar..... 18 g

pH ..... 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

**Composition de milieu YMA +Carbonates de Calcium en g/l (Vincent, 1970)**

YMB.....1000 ml

CaCO<sub>3</sub>.....3g

Agar.....18g

pH.....6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

**Composition de milieu GPA (Glucose Pepton Agar) + BCP (pourpre de bromocrésol)  
en g/l ( Vincent, 1970)**

Glucose.....10 g

Peptone.....5 g

Solution stock de BCP.....10 ml

Agar.....18g

pH .....6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### **Composition de milieu TY (Tryptone Yeast) en g/l (Beringer, 1974)**

Tryptone.....5 g  
 Extrait de levure.....3 g  
 CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O..... 0,87 g  
 pH.....6,8  
 Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

### **Les solutions stocks colorants**

- **Solution stock de Rouge Congo** : 0.25g de Rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.
- **Solution stock de bleu de Bromothymol** : 0.5g BTB dissous dans 100 ml d'éthanol
- **Solution de pourpre de bromocrésol** : 1g de BCP disous dans 100 ml d'éthanol

**Annexe 02****Tableau 1** : Résultats de la mesure de la densité optique après 48 heures d'incubation pour le test de la tolérance des isolats au différents pH

Isolats	pH4	pH5	pH6,8	pH8	pH10
O.v1	0,113	0,287	0,345	0,438	0,481
O.v2	0,232	0,323	0,357	0,27	0,493
O.v3	0,211	0,229	0,218	0,177	0,257
O.v4	0,08	0,223	0,321	0,335	0,111
O.v5	0,067	0,165	0,083	0,283	0,097
O.v6	0,147	0,229	0,227	0,34	0,276
O.v7	0,244	0,323	0,433	0,455	0,555
O.v8	0,59	0,546	0,618	0,566	0,794
O.n1	0,156	0,227	0,253	0,198	0,242
O.n2	0,173	0,335	0,283	0,271	0,367
O.n3	0,216	0,183	0,229	0,209	0,259
O.n4	0,072	0,196	0,175	0,209	0,409
O.n5	0,407	0,361	0,178	0,405	0,669

<b>Année universitaire : 2024-2025</b>	<b>Présenté par : GRINE Aya Noursaf</b> <b>KADRI Imene</b> <b>KHOUDER Khadidja</b>
<b>Caractérisation des BNL chez deux espèces du genre <i>Ononis</i> L.</b>	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée</b>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>La famille des légumineuses joue un rôle fondamental dans l'amélioration de la fertilité des sols grâce à leur capacité à établir une symbiose avec des bactéries du sol appelées rhizobiums. Ce travail a pour objectif l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries nodulant <i>Ononis viscosa</i> et <i>Ononis natrix</i>, deux espèces de plantes légumineuses collectées dans la région de Constantine (Nord-Est algérien). Les bactéries isolées à partir des nodules ont été soumises à des analyses morphologiques, biochimiques et physiologiques (tests enzymatiques, tolérance au pH, à la température et à la salinité). L'étude a révélé une diversité notable parmi les souches, certaines montrent une grande tolérance aux stress abiotiques (pH extrêmes, salinité élevée, températures allant jusqu'à 42 °C) et une capacité à produire des enzymes hydrolytiques variées. Ces résultats suggèrent que les isolats présentent des caractéristiques proches des bactéries à croissance rapide (BNL), bien qu'une identification taxonomique précise reste à approfondir.</p>	
<b>Mots-clés :</b> Symbiose; BNL; <i>Ononis viscosa</i> ; <i>Ononis natrix</i> ; Caractérisation phénotypique.	
<b>Laboratoires de recherche :</b> laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (U. Constantine 1 Frères Mentouri).	
<b>Présidente du jury :</b> Mme. Gaci Meriem (MCB - U. Constantine1 Frères Mentouri). <b>Encadrant :</b> Mr. Benhizia Yacine (Prof - U. Constantine1 Frères Mentouri). <b>Examineur:</b> Mr. Chabbi Rabah (MAA - U. Constantine1 Frères Mentouri).	