



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبولوجيا

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

**Isolement et caractérisation des bactéries nodulants les racines de la plante
légumineuse du genre *Ononis* L. poussant dans la région de Boussaâda.**

Présenté par : Belamouche Aycha

Le : 30/06/2025

Mekhloufi Fella

Jury d'évaluation :

Président : Benhizia Yacine (Professeur - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Chabbi Rabah (Maitre-assistant « A » - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinateur : Guergouri Ibtissem (Maitre de conférence « B » - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire 2024 – 2025

Remerciement

*Avant toute chose, nous exprimons notre profonde gratitude envers **Allah** Tout-Puissant, qui nous a accordé le courage, la volonté et la force nécessaires pour mener à bien ce travail. Que Sa lumière continue d'éclairer notre chemin vers la réussite.*

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrant, **Mr. Chabbi Rabah**, pour sa patience inépuisable, sa disponibilité constante et ses conseils avisés, qui ont guidé notre réflexion avec rigueur et bienveillance.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, le professeur **Benhizia Yacine** et **Mme. Guergouri Ibtissem**, pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce mémoire avec sérieux et impartialité.*

*Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à Monsieur **Benhizia Yacine** Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC), Faculté des Sciences de la Nature, Université des Frères Mentouri – Constantine, pour nous avoir accueillis chaleureusement au sein de son équipe. Son soutien institutionnel et les conditions de recherche favorables qu'il a offertes, ayant grandement contribué à la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à **Madame Radja** pour la mise à disposition des nodules ayant permis la réalisation de cette étude et aussi à **Madame Houda**, ingénierie de laboratoire, pour sa disponibilité, ses conseils avisés et son accompagnement technique tout au long de notre travail. Son professionnalisme et sa bienveillance ont grandement facilité la réalisation de nos expérimentations. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance.*

Résumé

Les légumineuses ont la particularité de s'associer avec des bactéries du sol appartenant à la famille des (*Rhizobiaceae*). L'objectif de notre travail est d'isoler des bactéries à partir des nodules de deux plantes légumineuses du genre *Ononis* L. prélevées dans la région de Boussaâda. Pour répondre à cet objectif une caractérisation de 10 isolats porté sur une étude morphologique effectuée sur plusieurs milieux de cultures, suivie de tests physiologiques et biochimiques et enfin une étude du profil d'assimilation des sucres des isolats est réalisée à l'aide de mini galeries biochimiques (galerie API 20E). À la base des résultats obtenus les isolats présentent un profil phénotypique similaire à celui des bactéries nodulantes les légumineuses (BNL). Toutefois, afin d'identifier précisément leur genre bactérien et de valider leur rôle potentiel en tant que bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, il serait pertinent de compléter cette étude par une analyse moléculaire.

Mots clés : *Rhizobiacées*, nodules, *Ononis* L. caractérisation, phénotypique, BNL.

Abstract

Leguminous plants have the unique ability to associate with soil bacteria belonging to the *Rhizobiaceae* family. The objective of our study is to isolate bacteria from the root nodules of two legume species of the genus *Ononis* L. collected in the Bousaâda region. To achieve this, ten isolates were characterized through morphological studies on various culture media, followed by physiological and biochemical tests. Additionally, a sugar assimilation profile was assessed using biochemical mini-galleries (API 20E system). Based on the results obtained, the isolates exhibited a phenotypic profile similar to that of legume-nodulating bacteria (LNB). However, to accurately determine their bacterial genus and validate their potential role as symbiotic nitrogen-fixing bacteria, it would be appropriate to complement this study with molecular analysis.

Keywords: *Rhizobiaceae*, nodules, *Ononis* L. characterization, phenotypic, LNB.

الملخص

للبقوليات القدرة على الإرتباط ببكتيريا التربة المنتمية لعائلة (Rhizobiaceae) الهدف من عملنا هذا هو عزل بكتيريا من العقد الجذرية لنوعين من البقوليات من جنس *Ononis* L. جمعت من منطقة بوسعداء. للإجابة على هذا المباغى، الدراسة الوصفية ل 10 عزلات بكتيرية قامت على دراسة مرفولوجية على أوساط زرع، متبوعة باختبارات فيزيولوجية وبيوكيميائية وفي الأخير دراسة القدرة على استعمال السكريات باستخدام مجموعات اختبارية (API) 20E بناء على النتائج المحصلة أظهرت العزلات نمط ظاهري مشابه للبكتيريا المكونة للعقد الجذرية على البقوليات ومع ذلك للمعرفة الدقيقة للجنس والدور الفعال كبكتيريا متعادلة مثبتة للأزوت يجب دعم وامال هذه الدراسة بتحاليل الوراثة الجزيئية.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيا *Ononis* L. ، العقد الجذرية، وصف مظاهري، BNL.

Table de matière

<i>Introduction</i>	1
<i>Revue bibliographique</i>	3
1. La rhizosphère	3
1.1. Les microorganismes de la rhizosphère	4
1.1.1. Les bactéries.....	4
1.1.2. Les champignons	4
2. Cycle d'Azote	4
3. Fixation biologique de l'azote.....	6
4. La symbiose Bactérie-plante légumineuse	6
4.1. Les légumineuses	6
4.2. Les légumineuses en Algérie.....	9
4.3. Intérêt des légumineuses	9
4.3.1. Intérêt du genre <i>Ononis</i> L.	10
5. Description du genre <i>Ononis</i> L.	10
5.1. L'espèce <i>Ononis serrata</i> Forsk.	11
5.2. L'espèce <i>Ononis angustissima</i> L.....	12
5.3. Classification des espèces <i>Ononis serrata</i> Forsk. et <i>Ononis angustissima</i> L.....	14
6. Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL).....	14
6.1. Les rhizobiums.....	14
6.2. Taxonomie des rhizobiums	14
7. la nodulation	16
7.1. Formation des nodules	16
<i>Matériel et méthodes</i>	18
1.2 Collecte des nodules.....	19

1-4 Conservation des nodules	20
2. Isolement des souches à partir des nodules.....	20
2.1. Stérilisation des nodules.....	20
2.2 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés	21
3. Caractères morphologique et culturaux	22
3-1. Principaux milieux de culture utilisés	22
3-3. Examen microscopique.....	22
3-3-1. Coloration de Gram.....	22
4. Conservation des isolats.....	23
4-1. Conservation à court terme.....	23
4-2. Conservation à long terme	23
5. Tests biochimiques	23
5-1. Test de catalase.....	23
5-2. Test d'oxydase	23
5.3. Test du Mannitol-mobilité	24
5-4. Recherche de l'enzyme nitrate réductase	24
5-5. Hydrolyse de l'urée	24
5-6. Activité cellulosique	24
6. Tests physiologiques.....	25
6-1. Température de croissance	25
6-2. Croissance à différentes valeurs du pH	25
6-3. Effet de NaCl	25
7. Étude du profil d'assimilation des sucres des isolats à l'ide de galerie API 20E.....	26
7-1. Principe	26
7-2. Technique.....	26
7-2-1. Préparation de la galerie	26
7-2-2. Préparation de l'inoculum	26

7-2-3. Inoculation de la galerie	26
<i>Résultats et discussion</i>	28
1. Test de stérilisation.....	28
2. Aspect microscopique et macroscopique.....	29
2.1. Aspect microscopique	29
2.2. Croissance sur YMA+ Rouge Congo.....	30
2.3. Croissance sur milieu GPA+BCP	31
5. Test du Mannitol mobilité	34
6. Réduction des nitrates.....	35
8. Activité cellulosique.....	37
9. Effet de la température.....	38
10. Effet du pH.....	41
11. Effet de NaCl.....	43
<i>Conclusion</i>	46
<i>Références bibliographiques</i>	46
<i>Annexes</i>	46

Liste des abréviations

(p/v): poids/volume.

Asso : Ignacio Jordan de Asso y del Rio

BCP : Pourpre de Bromocrésol.

BNF : Biological Nitrogen Fixation.

BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses.

Boiss : Boissier.

BTB : Bleu de Bromothymol.

CCaMK : Kinase dépendante du calcium et de la calmoduline.

CMC : Carboxy-Méthyl-Cellulose.

Coss : Cossion.

Desf : Desfontaines.

DO : Densité Optique.

Dur : Durieu.

FN : Facteur Nod.

Forsk : Forsskal.

GPA : Glucose Peptone Agar.

Guss : Giovanni Gussone

L : Linné.

LCO : Lipochitooligosaccharides.

Lys : Lysine Motif.

M : Mole.

mm : milli mol.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

Pioret : Jean Louis Marie pioret.

Pomel : Auguste Nicolas Pomel.

RC: Rouge Congo.

T Y: Tryptone Yeast.

Ten : Michele Tenore

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMB: Yeast Mannitol Broth.

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TROIS ZONES DE LA RHIZOPHERE(LEPINAY,2013).....	3
FIGURE 2: CYCLE DE L'AZOTE (DOUBECH, 2019).....	11
FIGURE 3: PHYLOGENIE ET CLASSIFICATION DES SOUS FAMILLES DES LEGUMINOSAE (AZANI ET AL., 2017).....	8
FIGURE 4: <i>ONONIS SERRATA</i> FORSK. (BAKKER).....	11
FIGURE 5: <i>ONONIS ANGUSTISSIMA</i> L. (BOTANY.CZ, 2006)	13
FIGURE 6: ARBRE PHYLOGENETIQUE SIMPLIFIE DE L'ADNR 16S D'A, B, Γ -PROTEOBACTERIES. (MASSON-BOIVIN ET AL., 2009).....	15
FIGURE 7: PROCESSUS DE NODULATION (FAGHIR, 2012).....	17
FIGURE 8: LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DE LA ZONE DE PRELEVEMENT.	18
FIGURE 9: LA PARTIE RACINAIRE DE LA PLANTE.	19
FIGURE 10 : (A) CONSERVATION DES NODULES SOUS CACL₂ (VINCENT, 1970). (B) CONSERVATION DES NODULES RACINAIRES DE LA PLANTE ONONIS.....	20
FIGURE 11: METHODE D'ENSEMENCEMENT DES QUATRE CADRANS (VINCENT, 1970).....	21
FIGURE 12: LA GALERIE API 20E.....	27
FIGURE 13: ASPECT MICROSCOPIQUE DES ISOLATS (OBJECTIF X100).	29
FIGURE 14: CROISSANCE SUR MILIEU YMA+RC.....	30
FIGURE 15: CROISSANCE SUR MILIEU GPA +BCP.....	31
FIGURE 16: CROISSANCE SUR MILIEU YMA+BTB.....	32
FIGURE 17: TEST DE CATALASE POSITIF.....	33
FIGURE 18 : TEST OXYDASE.....	34
FIGURE 19 : TEST DE MANNITOL MOBILITE.....	35
FIGURE 20 : REDUCTION DES NITRATES.....	36
FIGURE 21: TEST D'UREASE.....	37
FIGURE 22: TEST DE CELLULASE POSITIF(+).	38
FIGURE 23: EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DES ISOLATS.	40
FIGURE 24: EFFET DU PH SUR LA CROISSANCE DES ISOLATS.....	42
FIGURE 25 : EFFET DU NACL SUR CROISSANCE DES ISOLATS.	44
FIGURE 26: RESULTATS DES GALERIES API 20E.....	46

Liste des tableaux

TABLEAU 1: LES SOUCHES ISOLEES ET ETUDES.....	28
TABLEAU 2: RESULTATS DES DEUX TESTS CATALSE ET OXYDASE.....	34
TABLEAU 3: RESULTATS DU TEST DE MANNITOL MOBILITE	35
TABLEAU 4 : CROISSANCE DES ISOLATS A DIFFERENTES TEMPERATURE.....	39
TABLEAU 5: RESULTATS DE LA GALERIE API 20E DES ISOLATS ETUDES.....	45

Introduction

L'azote, élément essentiel et omniprésent dans de nombreuses biomolécules telles que les protéines, les acides nucléiques et les vitamines, représente le constituant végétal le plus important après le carbone. Cependant, la disponibilité des formes assimilables de l'azote dans le sol, comme l'ammonium et le nitrate, est souvent limitée, ce qui restreint la croissance optimale des plantes et constitue fréquemment un facteur déterminant de la production agricole (Roger, 1996).

Certaines plantes, notamment les légumineuses, ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec des bactéries du sol appelées BNL, ou « Bactéries Nodulantes des Légumineuses » (Graham et Vance 2003).

L'association symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia permet à la plante d'acquérir de l'azote sous une forme réduite, tout en fournissant à la bactérie les nutriments indispensables à sa croissance. Toutefois, la survie des rhizobia dans le sol, la formation des nodules et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus particulièrement sensibles à divers facteurs environnementaux (Wery, 1985).

Les bactéries nodulantes des légumineuses, sont des bactéries du sol à Gram négatif qui présentent un intérêt scientifique et agronomique considérable en raison de leur capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote (N_2) avec les légumineuses. Cette relation symbiotique joue un rôle essentiel dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols (Somasegaran et Hoben, 1994).

Notre travail consiste à étudier des bactéries nodulantes les racines de deux espèces de la plante du genre *Ononis* L. récoltées de la région de Boussaâda : *Ononis angustissima* L. et *Ononis serrata* Forsk.

Nous avons commencé par un isolement des bactéries à partir des nodosités de cette plante, ces bactéries ont ensuite été soumises à une étude phénotypique :

- Etude macroscopique, microscopique (coloration de Gram)
- Etude biochimiques (recherche de la catalase et l'oxydase, mannitol-mobilité.... etc.),
- Etude physiologique (Température, pH, NaCl),
- Étude du profil d'assimilation des sucres des isolats à l'aide des galeries API 20 E.

Ce mémoire est structuré en trois volets :

Le premier volet de ce travail a porté sur une étude bibliographique concernant les rhizobiums et les légumineuses, en mettant l'accent sur leurs liens symbiotiques dont l'objectif est de situer notre travail dans son contexte scientifique.

Le deuxième volet présente de manière détaillée les techniques et les protocoles expérimentaux utilisés pour mener à bien ce travail.

Le troisième volet est dédié à l'analyse des résultats obtenus et à leur discussion.

Ce mémoire se conclut par une synthèse des principaux résultats, accompagnée de perspectives de recherche pour approfondir les travaux futurs.

*Revue
bibliographique*

1. La rhizosphère

Le terme "rhizosphère" a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner. "Rhizo" provient du grec "rhiza", ce qui signifie "racine", et "sphère" qui signifie champ d'influence (l'environnement naturel) (Darrah *et al.*, 2006). La rhizosphère est la zone de sol influencée par l'activité des racines des plantes. Cet espace joue un rôle essentiel dans les interactions entre la plante et les microorganismes du sol, ainsi qu'entre les microorganismes eux-mêmes. L'étendue de l'influence des racines sur les activités microbiennes varie considérablement, en fonction du type de sol, de l'espèce végétale et des processus microbiens concernés. Les racines modifient de manière significative plusieurs propriétés du sol, telles que le pH, l'humidité et le potentiel redox. Par ailleurs, à travers leurs exsudats, elles libèrent divers nutriments, notamment des sucres et des acides organiques, qui stimulent l'activité microbienne et leurs interactions (Claude et Christelle, 2018).

La rhizosphère se divise en trois zones (figure 1) :

- **Le rhizoplan** (la surface des racines).
- **L'ectorhizosphère** (le sol qui adhère aux racines ou sol rhizosphérique). Dans cette zone, la plante libère divers éléments carbonés, dont les produits de la photosynthèse, appelés rhizodépôts (Clémentine, 2013).
- **L'endorhizosphère** (les tissus racinaires) ; Dans cette zone, certains micro-organismes ont la capacité de coloniser les racines et d'influencer leur développement (Seshadri *et al.*, 2015).

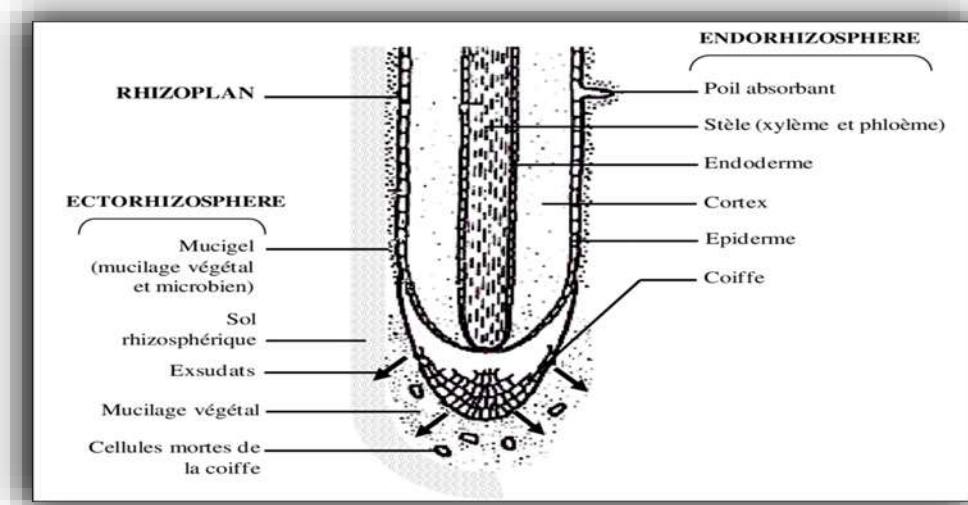


Figure 1 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (lepinay, 2013).

1.1. Les microorganismes de la rhizosphère

Le sol, comme l'ont largement démontré de nombreuses études, constitue un environnement riche en une diversité microbienne remarquable (Wogene *et al.*, 2024). La rhizosphère abrite une grande variété de micro-organismes, tels que des bactéries, des champignons, des protozoaires et des algues, qui coexistent dans cet environnement (Mwajita *et al.*, 2013).

1.1.1. Les bactéries

Les bactéries présentes dans la rhizosphère, appelées rhizobactéries, ont la capacité de coloniser à la fois l'intérieur et l'extérieur des racines de nombreuses espèces végétales. Certaines de ces bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique, le rendant ainsi disponible pour les plantes. Certaines forment des relations symbiotiques avec les légumineuses (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, etc...), tandis que d'autres vivent librement dans le sol, telles que *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.* et *Pseudomonas spp.* (Rahimi et Fetimi, 2022).

1.1.2. Les champignons

Les champignons du sol sont des micro-organismes filamentueux, unicellulaires, hétérotrophes et ubiquitaires. Ils constituent l'un des groupes d'organismes les plus importants au monde, jouant un rôle essentiel dans de nombreux écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007).

Ces champignons peuvent établir une relation mutualiste avec les racines des plantes, échangeant des nutriments et des composés organiques. En retour, ils reçoivent des sucres et d'autres substances essentielles produites par la plante. Ils jouent un rôle clé dans la santé des plantes et la fertilité du sol, en facilitant l'absorption des nutriments, comme le phosphore, et en améliorant l'absorption de l'eau. De plus, ils contribuent à la protection des racines contre les pathogènes et à la dégradation des résidus végétaux (Smith et Read, 2008).

2. Cycle d'Azote

L'azote atmosphérique, qui constitue environ 78 % du volume de l'air, représente la principale source d'azote sur terre. En plus du diazote (N_2), l'atmosphère contient de faibles quantités d'ammoniac (NH_3) et d'oxydes d'azote (N_2O , NO_2 , NO), issus des émissions industrielles, des incendies de forêt et des activités volcaniques. Les organismes vivants,

y compris les plantes et les animaux, contribuent également à ces émissions en libérant de petites quantités de NH_3 .

L'azote est un élément fondamental pour tous les êtres vivants, car il entre dans la composition des protéines et des acides nucléiques son assimilation par les organismes dépend de processus biologiques spécifiques (Jakubowski et Flatt, 2025).

Le cycle de l'azote se déroule en cinq étapes clés (figure 2) :

- **La fixation de l'azote** : où le diazote atmosphérique est transformé en ammoniac (Bernhard, 2010).
- **La nitrification** : qui convertit l'ammoniac en nitrites puis en nitrates.
- **L'assimilation** : où les plantes et les animaux intègrent l'azote dans leurs biomolécules (Enviroliteracy Team, 2025).
- **L'ammonification** : qui libère l'ammoniac à partir de matières organiques décomposées (Bernhard, 2010).
- **La dénitrification** : où certaines bactéries transforment le nitrate en gaz d'azote, le renvoyant dans l'atmosphère .

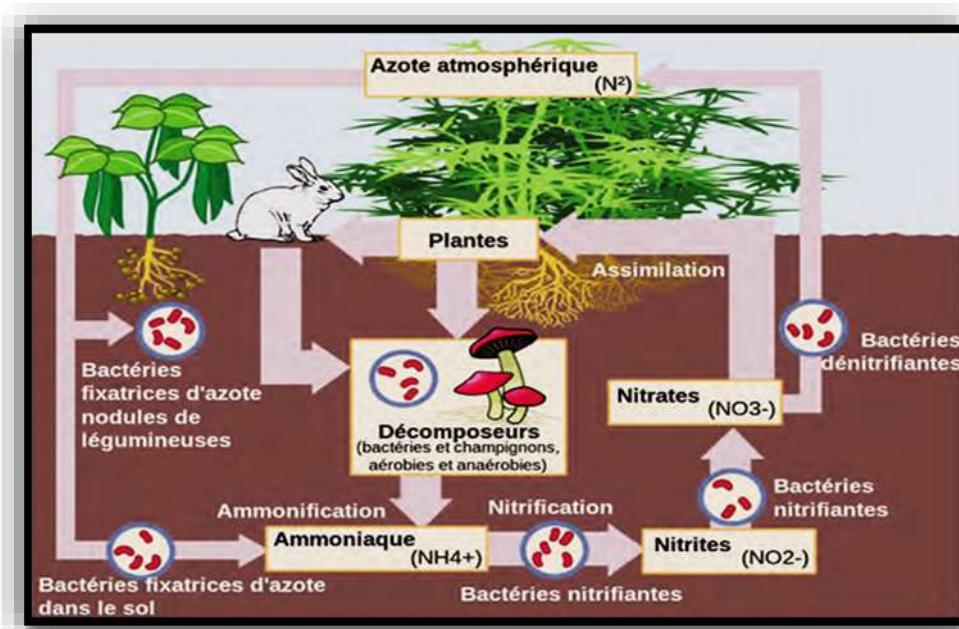


Figure 2 : Cycle de l'Azote (Doucech, 2019)

3. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote (BNF) est un mécanisme fondamental pour une agriculture durable, à travers lequel certains microorganismes, notamment les bactéries du genre *Rhizobium*, transforment le diazote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3) grâce à l'action de l'enzyme nitrogénase. Cette conversion est essentielle pour enrichir les sols en azote assimilable et réduire la dépendance aux fertilisants chimiques (Liu et Murray ,2016).

Les bactéries du genre *Rhizobium*, établissent une symbiose avec les légumineuses au sein de nodules racinaires. Une fois l'ammoniac formé, il est soit directement assimilé par la plante sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) pour la synthèse des acides aminés, soit transformé par le processus de nitrification. Cette réaction aérobie, assurée par des bactéries nitrifiantes telles que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, conduit à la conversion de l'ammoniac en nitrites (NO_2^-), puis en nitrates (NO_3^-), facilitant ainsi l'absorption de l'azote par les plantes. Cependant, en milieu anaérobie, la dénitrification intervient pour rééquilibrer le cycle de l'azote. Ce processus, orchestré par des bactéries dénitrifiantes comme *Pseudomonas* et *Paracoccus*, permet la réduction des nitrates en diazote (N_2), qui retourne à l'atmosphère, contribuant ainsi à la régulation de l'azote disponible dans les écosystèmes (Bernhard ,2010).

4. La symbiose Bactérie-plante légumineuse

La famille des légumineuses se caractérise par sa grande capacité à former une symbiose spécifique avec des microorganismes du sol (rhizobiums), permettant ainsi la fixation de l'azote atmosphérique pour satisfaire ses besoins en azote et garantir le bon fonctionnement de son métabolisme (Louarn *et al.*, 2016). Cette particularité permet aux cultures de légumineuses de bénéficier d'une plus grande disponibilité en azote minéral assimilable, tout en jouant un rôle essentiel dans les flux des systèmes de production végétale (Voisin et Gastal, 2015).

Les bactéries symbiotiques échangent des signaux moléculaires avec la plante hôte qui lui confère les sucres et son partenaire bactérien aboutissant à la formation de nodosités dont lesquelles il fixe l'azote atmosphérique (Yaw Boakye *et al.*, 2016).

4.1. Les légumineuses

La famille des Légumineuses est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. Elles regroupent une grande variété de plantes, telles que les pois, les haricots, les lentilles, les fèves et les sojas, qui sont non seulement une source essentielle de protéines pour l'alimentation humaine et animale, mais également un pilier pour la durabilité des sols (Vance et Saito, 2001).

Le fruit de cette famille, appelé gousse ou légume, est à l'origine du nom sous lequel elle est communément désignée (Ozenda, 1991).

La famille des légumineuses (Fabacées) est la troisième plus grande famille d'angiospermes, après les Orchidacées et les Astéracées. Avec environ 770 genres et près de 20 000 espèces recensées à ce jour. Les légumineuses, présentes sur tous les continents, constituent, après les céréales, la deuxième famille de plantes la plus importante sur le plan économique. Autrefois, elles étaient classées en trois sous-familles : les Papilionacées, les Mimosacées et les Caesalpiniacées (Azani *et al.*, 2017).

Les Fabacées ont été reclassées et sont désormais réparties en six sous-familles : *les Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, ainsi que *les Caesalpinoideae* et *Faboideae*. Ce sont principalement ces deux dernières qui regroupent les espèces capables de former une symbiose fixatrice d'azote avec des micro-organismes tels que *les rhizobia* ou *Frankia* (Figure 3) (Azani *et al.*, 2017).

Environ 70 % des espèces de légumineuses sont capables de former des nodules en association avec les rhizobia, incluant 96 % des anciennes *Papilionacées*, 90 % des *Mimosacées* et 22 % des *Caesalpiniacées* (Sprent, 2009).

La sous-famille des *Caesalpinoideae* présente une grande hétérogénéité, comprenant 148 genres incluant ceux précédemment classés dans l'ancienne sous-famille des *Mimosoideae* et regroupant environ 4400 espèces. Celles-ci sont majoritairement des arbustes et lianes évoluant dans les régions tropicales et subtropicales, bien que l'on y trouve également quelques espèces arborées adaptées aux zones tempérées (Azani *et al.*, 2017).

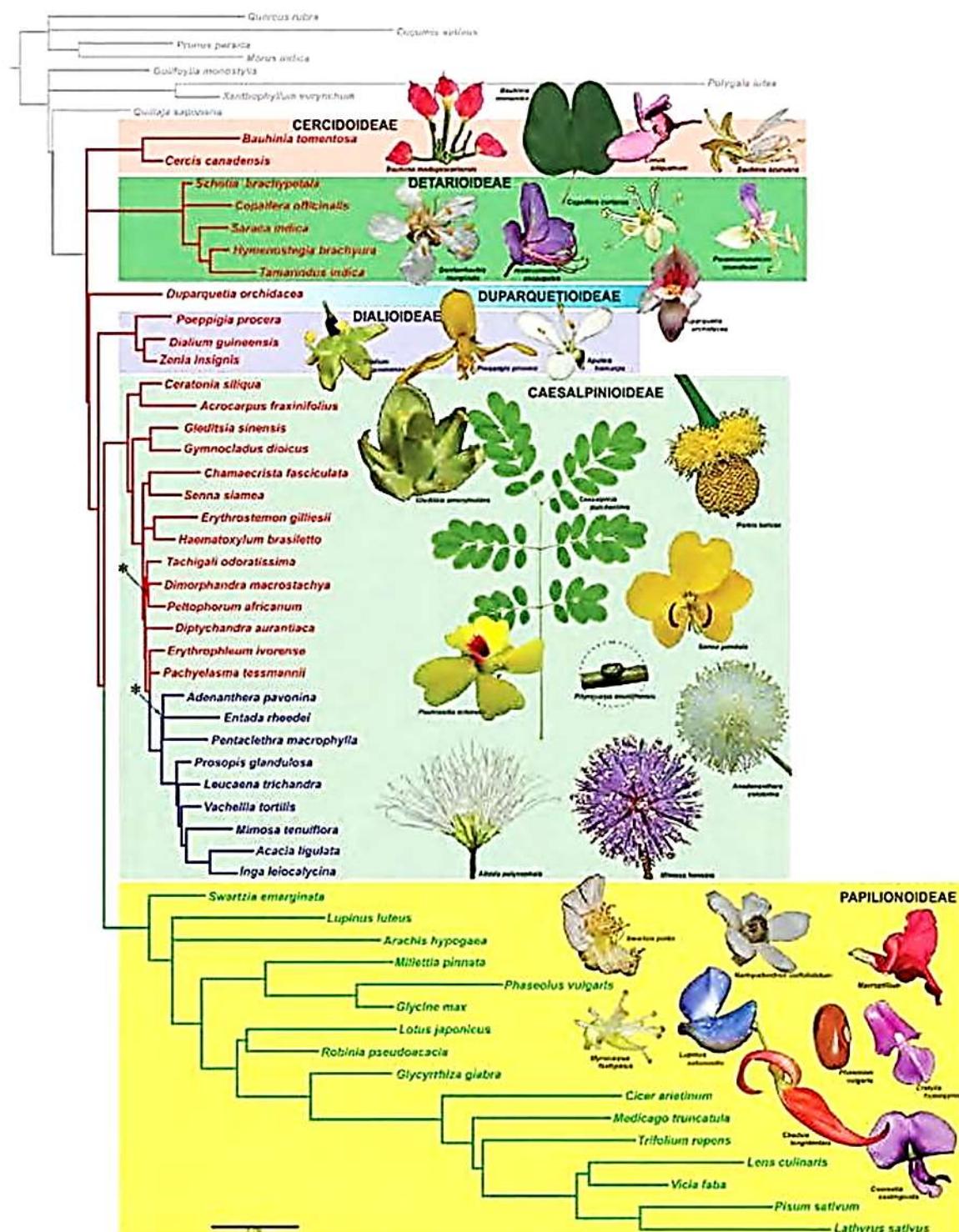


Figure 3: Phylogénie et classification des sous familles des *léguminosae* (Azani *et al.*, 2017).

Les six sous familles sont indiquées par les encadrements colorés à droite de la phylogénie. Les branches colorées indiquent l'ancienne classification de sous famille des *Leguminosae* : en rouge les anciens *Caesalpinoideae*, en bleu les *Mimosoideae* et en vert les *Papilionoideae* (Azani *et al.*, 2017).

4.2. Les légumineuses en Algérie

L'Algérie, de par sa position géographique stratégique ainsi que son riche passé historique et culturel, a toujours été un carrefour de civilisations. Dans ce contexte, les légumineuses alimentaires occupent une place prépondérante à la fois dans les systèmes de culture et dans le régime alimentaire de la population (Rahmani, 2015).

En agriculture, les légumineuses sont généralement classées en deux grandes catégories : les légumineuses fourragères telles que la luzerne, le sainfoin ou encore les trèfles cultivées pour l'alimentation animale sous forme de plante entière ; et les légumineuses à graines, récoltées à maturité, destinées à l'alimentation humaine et animale, sous forme brute ou transformée. Ces dernières comprennent, entre autres, les haricots, les lentilles, les pois, les pois chiches, les fèves, le soja ou encore les lupins (Agreste, 2008).

En Algérie, les principales légumineuses à graines se répartissent en plusieurs groupes :

- **Les protéagineux**, regroupant le pois protéagineux, la féverole et le lupin ;
- **Les oléagineux**, comprenant le soja ;
- **Les légumes secs**, tels que la lentille, le haricot sec et le pois cassé ;
- **Les légumes à cosses**, incluant le petit pois frais, le haricot vert, le haricot à écosser ainsi que les haricots semi-secs (Agreste, 2008).

4.3. Intérêt des légumineuses

La famille des *Leguminosae*, l'un des groupes les plus importants de plantes économiques après les graminées (*Poaceae*), regroupe de nombreuses espèces cultivées pour leurs graines, ainsi que pour leur utilisation dans la production d'huiles, de combustibles et de bois d'œuvre (Lavin *et al.*, 2005). Elles sont reconnues comme une excellente source de minéraux (fer, cuivre, zinc...), de vitamines (notamment la vitamine B9) et de fibres alimentaires (Lafond et Pageau, 2007).

Les espèces de légumineuses diffèrent par leur contenu et leur type de l'alimentation. Elles présentent l'avantage de posséder un taux élevé de protéines qui servent de complément alimentaire (Pointereau, 2015), ainsi ils contiennent des composés bioactifs, inhibiteurs d'enzymes, lectines, phytoestrogènes, oligosaccharides, saponines, et composés phénoliques.

La phytothérapie : les graines de légumineuses offrent une protection contre troubles métaboliques, athérosclérose et hypertension (Dupont, 2020).

4.3.1. Intérêt du genre *Ononis* L.

En médecine traditionnelle, les espèces du genre *Ononis* L. ont été largement utilisées pour traiter divers troubles, notamment la jaunisse, les inflammations des voies urinaires, les calculs rénaux, ainsi que les plaies, l'eczéma, les rhumatismes, le cancer et les lésions cutanées certaines, comme *Ononis spinosa* et *Ononis arvensis*, sont particulièrement reconnues pour leurs propriétés analgésiques, diurétiques, laxatives et antiseptiques (Süntar *et al.*, 2011).

Par ailleurs, des recherches scientifiques ont confirmé que plusieurs espèces d'*Ononis* L. dont *O. viscosa*, possèdent une large gamme d'activités pharmacologiques : antidiabétiques, antibiotiques (notamment contre les bactéries à Gram positif), antifongiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires, antivirales et cytotoxiques (Süntar *et al.*, 2011 ; Tumova *et al.*, 2011 ; Santoro *et al.*, 2013 ; Youcef *et al.*, 2014 ; Ghribi *et al.*, 2015).

5. Description du genre *Ononis* L.

Les plantes peuvent être vivaces ou ligneuses, voire annuelles, avec un calice doté d'un tube glanduleux à l'intérieur et divisé en cinq parties profondes et presque égales. Elles présentent des folioles finement dentelées, accompagnées de fleurs aux teintes variées : roses, blanches ou pourpres. Les étamines sont monadelphes, avec des anthères uniformes ou réparties en deux groupes de tailles différentes (cinq grandes et cinq petites). L'ovaire est recouvert de poils, tandis que le style, en forme de pointe (subulé), est courbé et orienté vers le haut. Les gousses sont sessiles ou presque, déhiscences, saillantes ou incluses, avec des formes variées mais souvent renflées. Les feuilles sont généralement trifoliées, bien qu'elles puissent être unifoliées ou multifoliées dans certains cas (Quezel et Santa, 1962).

Selon (Mezrag, 2019) le genre *Ononis* L. fait partie de la tribu des *Trifolieae*, l'une des 31 tribus de la sous-famille *Papilionoideae*. Il regroupe environ 75 espèces largement réparties dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale. En Algérie, on retrouve principalement certaines espèces appartenant à ce genre :

<i>O. cenisia</i> (L.)	<i>O. sicula</i> (Guss.)	<i>O. alba</i> (Poiret.)
<i>O. crinita</i> (Pomel.)	<i>O. rosea</i> (Dur.)	<i>O. villosissim</i> (Desf.)
<i>O. serrata</i> (Forsk.)	<i>O. hirta</i> (Desf.)	<i>O. avellana</i> (Pomel.)
<i>O. mitissima</i> (L.)	<i>O. cephalantha</i> (Pomel.)	<i>O. diffusa</i> (Ten.)
<i>O. cossoniana</i> (Boiss.)	<i>O. antennata</i> (Pomel.)	<i>O. alopecuroides</i> (L.)
<i>O. pubescens</i> (L.)	<i>O. ornithopodioides</i> (L.)	<i>O. fruticosa</i> (L.)
<i>O. viscosa</i> (L.)	<i>O. incisa</i> (Coss.)	<i>O. natrix</i> (L.)
<i>O. serotina</i> (Pomel.)	<i>O. laxiflora</i> (Desf.)	<i>O. angustissima</i> (L.)
<i>O. reclinata</i> (L.)	<i>O. minutissima</i> (L.)	<i>O. pendula</i>
<i>O. aragonensis</i> (Asso.)	<i>O. euphrasiaefolia</i> (Desf.)	<i>O. biflora</i> (Desf.)
<i>O. hispida</i> (Desf.)	<i>O. spinosa</i> (L.)	<i>O. variegata</i> (L.)

5.1. L'espèce *Ononis serrata* Forsk.

Cette plante annuelle, de petite taille (15 à 35 cm) et au port couché-étalé, se distingue par une pubescence glanduleuse abondante et l'absence totale d'épines. Ses feuilles trifoliolées, portées par un pétiole, présentent des folioles elliptiques à oblongues, dentées en scie, tandis que les feuilles florales sont simples et de type bractéiforme.

Ses stipules sont effilées et lancéolées. Les fleurs, d'une teinte pourpre vive, s'organisent en grappes spiciformes denses et feuillues (Abbé, 2011).

Les pédoncules, très courts et non articulés, soutiennent des calices en forme de cloche, marqués par 3 à 5 nervures sur leurs lobes, qui dépassent la longueur du tube (figure 4). La corolle prolonge légèrement le calice.

Enfin, la gousse, large, ovale et pubescente, renferme deux grosses graines à texture rugueuse et tuberculeuse (Abbé, 2011).



Figure 6 : *Ononis serrata* Forsk. (Bakker).

5.2. L'espèce *Ononis angustissima* L.

C'est une plante herbacée capable de former de petits buissons avec des tiges très ramifiées à la base. Elle est reconnaissable grâce à ses fleurs jaunes portées par de longs pédoncules qui dépassent l'insertion de la fleur et forment des grappes lâches. Ses folioles, étroites et presque linéaires, sont peu ou pas dentées. Sa taille varie de 30 cm à 1 mètre, et elle est dotée d'une racine pivotante profonde.

À partir de sa base ligneuse et tortueuse s'élèvent des rameaux dressés, agglomérés et formant un dôme élevé. La plante est touffue avec de nombreuses tiges érigées et bien vertes.

Après la floraison, les rameaux restent persistants, deviennent légèrement épineux, et forment une touffe robuste. Ses feuilles trifoliées sont composées de folioles étroites, longues de quatre à cinq fois leur largeur, avec des bords parfois légèrement dentés. Elles portent deux stipules engainantes à leur base et un pétiole court (figure 5).

Le fruit, une gousse cylindrique, pendante, linéaire, brièvement stipulée, mesurant moins de 3 cm de long. Chaque gousse contient plusieurs graines courbées, brunes et tuberculées,

d'environ 1,5 mm de diamètre. La floraison s'étale principalement au mois de mars (Laouafi, 2017).



Figure 7: *Ononis angustissima* L. (Botany.cz, 2006).

5.3. Classification des espèces *Ononis serrata* Forsk. et *Ononis angustissima* L.

<i>Ononis angustissima</i> L.	<i>Ononis serrata</i> Forsk.
Règne : Eukaryot	Règne : Eukaryota
Classe : Magnoliopsida	Classe : Magnoliopsi
Ordre : Fabales	Ordre : Fabales
Famille : Fabaceae	Famille : Fabaceae
Sous-famille : Papilionoideae	Sous-famille : Papilionoideae
Tribu : Trifolieae	Tribu : Trifolieae
Genre : <i>Ononis</i>	Genre : <i>Ononis</i>
Espèce : <i>Ononis angustissima</i>	Espèce : <i>Ononis serrata</i>
(NCBI)	(NCBI)

6. Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL)

6.1. Les rhizobiums

Le terme Rhizobium vient du grec rhiza qui signifie "racine" et bio "vie", provient de la première appellation du premier genre bactérien vivant dans le sol et capable de noduler une légumineuse (Beijerinck, 1888).

6.2. Taxonomie des rhizobiums

La classification des Rhizobia est passée par un changement substantiel au cours des dernières années en raison de l'ajout de plusieurs genres et espèces de ce groupe de bactéries importantes (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

Le genre *Rhizobium* a été le premier groupe de bactéries symbiotiques identifié, ce qui explique son usage fréquent, par extension, pour désigner l'ensemble des bactéries fixatrices d'azote des légumineuses (Lindström et Mousavi, 2020).

Sur la base de la séquence de l'ADN ribosomique 16S, les symbiotes des légumineuses actuellement connus se répartissent en trois grandes sous-classes phylogénétiques : les α -, β - et γ -Protéobactéries (Figure 6) (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

À ce jour, ce groupe de bactéries est réparti en plus de 20 genres et comprend environ 200 espèces décrites (Lindström *et al.*, 2015).

Selon (Berrada et Fikri-Benbrahim ; 2014 ; Yan *et al.*, 2014).98 espèces de Rhizobia, réparties en 14 genres, ont été identifiées au sein des groupes des α - et β -Protéobactéries.

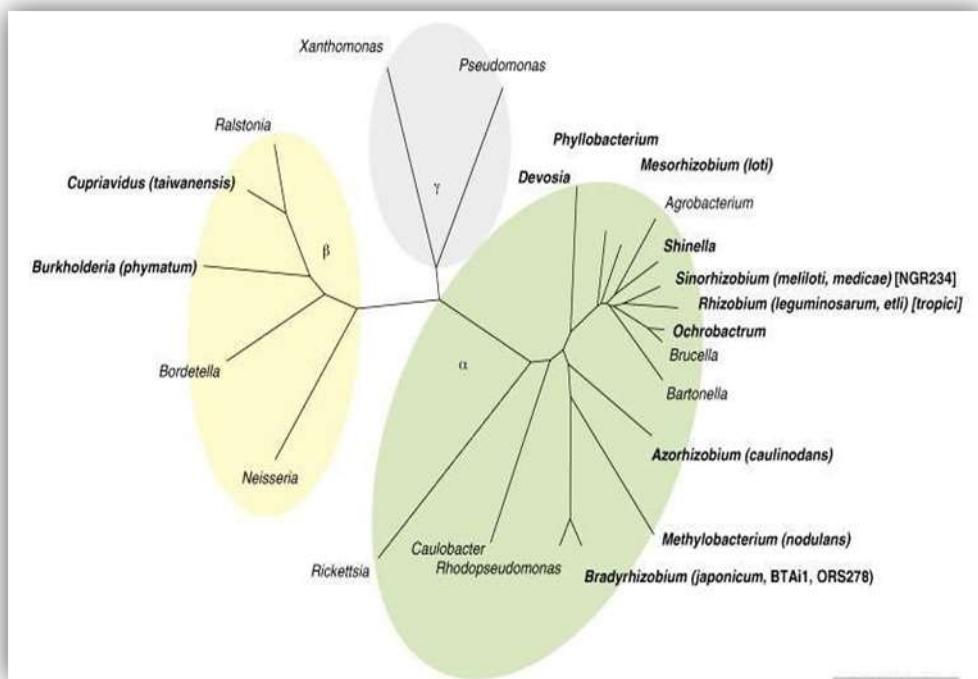


Figure 8: Arbre phylogénétique simplifié de l'ADNr 16S d' α , β , γ -Protéobactéries. (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

L'arbre phylogénétique présenté repose sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Les bactéries responsables de la nodulation des légumineuses (en gras) sont classées parmi les α et β -Protéobactéries. Un nombre restreint de γ -Protéobactéries a également été isolé à partir des nodules de certaines légumineuses.

7. la nodulation

Un nodule est un petit organe racinaire formé par les plantes légumineuses lorsqu'elles entrent en symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*. Ces nodules servent de structure spécialisée permettant aux bactéries, différenciées en bactéroïdes, de s'installer. Ils fournissent aux bactéries une niche écologique et les ressources nécessaires, tout en facilitant la fixation de l'azote atmosphérique, que les bactéries transfèrent à la plante sous une forme assimilable, comme l'ammoniac (Sanchez ,2017).

7.1. Formation des nodules

La formation des nodules chez les légumineuses commence par la libération de flavonoïdes par les racines végétales, qui sont détectés par la protéine régulatrice de transcription NodD des *rhizobiums*. Cette reconnaissance active l'expression des gènes nod et entraîne la synthèse des lipochitooligosaccharides (LCO), appelés facteurs Nod. En plus des flavonoïdes, d'autres composés végétaux comme le jasmonate, la vanilline, la bétaine et la xanthone peuvent également stimuler l'expression des gènes nod (Giraud, 2007).

Les *rhizobiums* s'attachent aux poils absorbants des racines et se retrouvent piégés dans une poche d'infection formée par la courbure de ces structures. Grâce à des enzymes comme la cellulase, les bactéries perforent les poils racinaires et pénètrent dans un cordon d'infection d'origine végétale, qui les sépare des cellules de la plante. Les plantes perçoivent les LCO via un complexe de récepteurs LysM qui transmettent des signaux par la voie de symbiose commune (SYM), entraînant des oscillations de calcium dans le noyau, décodées par une kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CCaMK) (Daubech, 2019).

À ce stade, les cellules du cortex racinaire se divisent activement sous l'effet des signaux bactériens, entraînant la création d'un nodule où les *Rhizobium* s'installent. Une fois à l'intérieur du nodule, elles commencent leur transformation en bactéroïdes (figure 7), préparant ainsi la fixation de l'azote atmosphérique (Liu et Murray, 2016).

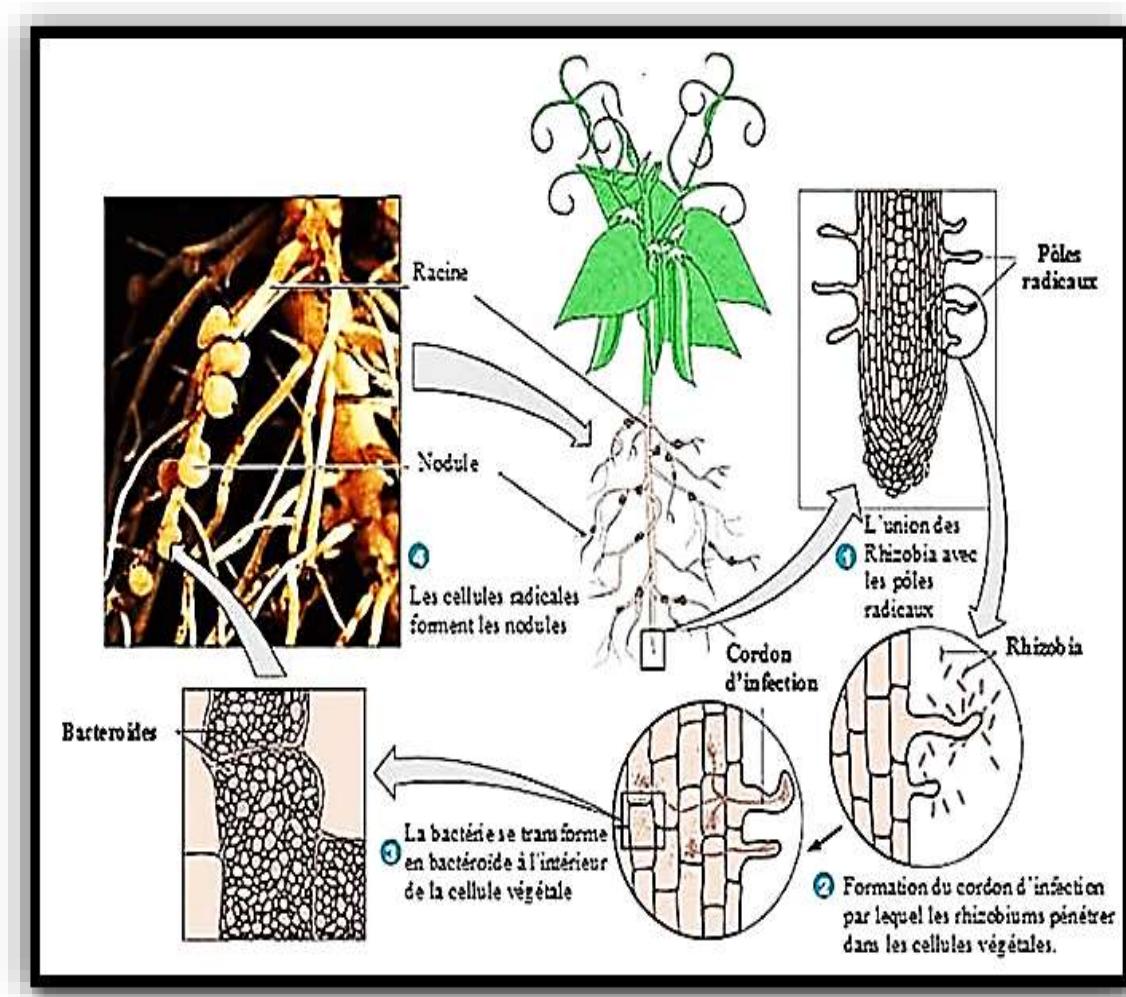


Figure 9: Processus de nodulation (Faghir, 2012).

Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude

Les nodules ont été obtenus à partir des racines de la plante *Ononis serrata* Forsk. et *Ononis angustissima* L. récoltées par madame Radja Tir dans la région de Boussaâda.

La ville de Boussaâda appartient à la wilaya de M'sila, situé dans le Sud-Est d'Alger à 234 km, précisément à la latitude 35.45102°N et la longitude 4.45842°E, limités au nord par la wilaya de Bouira et bordj Bou Arreridj et au sud par Djelfa et Biskra, à l'est par Batna et à l'Ouest par Médéa et Blida. La région se situe entre les hauts plateaux au sud-ouest du Hodna et l'Atlas saharien, au pied des monts Ouled Nail. Elle est distante du littoral d'environ 200 km (Aissou, 2019).



Figure 10: Localisation géographique de la zone de prélèvement.

<https://gifex.com/fr/fichier/carte-de-bou-saada/>.

1.1 Collecte des nodules

La collecte des plantes a été réalisée lorsque les nodules étaient bien visibles et facilement repérables sur les racines selon la méthode décrite par Vincent (1970) et Beck *et al.* (1993).

Elle consiste à :

- Creuser soigneusement à environ 15 cm autour de la plante afin d'extraire la plante entière avec son système racinaire, sans l'endommager.
- Éliminer manuellement la terre autour des racines, en prenant soin de ne pas détériorer les nodules.
- Placer délicatement la plante dans un sachet en plastique pour la préserver.
- Répéter cette opération sur plusieurs pieds afin d'obtenir un nombre suffisant de nodules pour l'étude.



Figure 11: La partie racinaire de la plante.

1.2 Prélèvements des nodules

La partie aérienne de la plante a été séparée de la partie racinaire. Les racines, avec leurs nodules (figure 9), ont ensuite été lavées délicatement à l'eau de robinet afin d'éliminer les résidus du sol. Les nodosités ont ensuite été soigneusement détachées des racines à l'aide d'un bistouri, puis séchées délicatement avec du papier absorbant.

1-3 Conservation des nodules

Une fois séchée sur papier absorbant, les nodules sont immédiatement placés au réfrigérateur température de 4° C en vue d'une utilisation dans un délai maximal de 48h. Toutefois, pour une conservation prolongée, estimée entre six à douze mois, il est recommandé de les stocker dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium (CaCl_2) (meilleure absorption de l'humidité), conformément au protocole décrit par Vincent (1970).

Le volume du flacon utilisé ne doit pas dépasser les 3/4 du volume total. Chaque flacon doit être étiqueté pour indiquer le nom de la plante, la date de conservation, et le lieu de collecte. Les flacons sont mis immédiatement au réfrigérateur à 4° C (Figure 10).

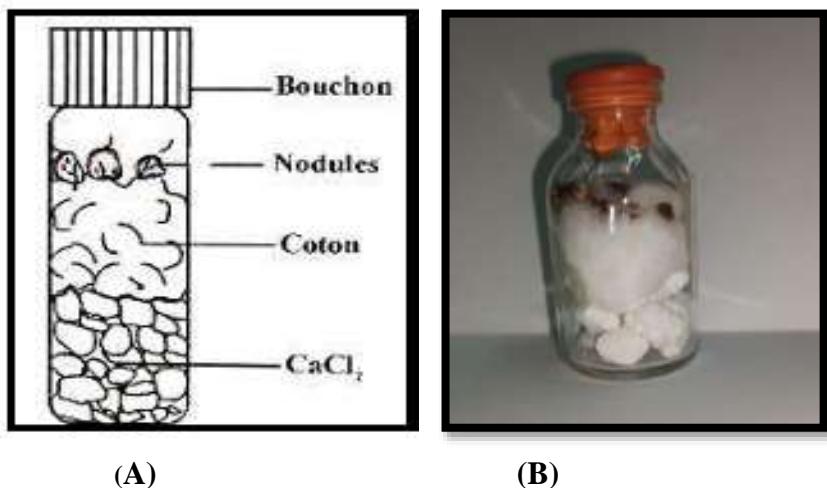


Figure 12 : (A) Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).
 (B) Conservation des nodules racinaires de la plante *Ononis*.

2. Isolement des souches à partir des nodules

Les différentes étapes d'isolement des rhizobiums sont celles décrites par Vincent (1970). Si les nodules ont été conservés dans un agent dessicatif, ils doivent d'abord être immergés dans de l'eau distillée et conservés au réfrigérateur pendant une nuit.

2.1. Stérilisation des nodules

La stérilisation s'effectue sous la hotte à flux laminaire (STERIL- BIO BAN) selon les étapes suivantes :

- Immerger les nodules intacts dans de l'éthanol à 95° pendant 5 à 10 secondes.
- Transférer immédiatement les nodules dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3% et laisser agir pendant 3 minutes.

- Rincer les nodules 10 fois avec de l'eau distillée stérile, en changeant l'eau à chaque rinçage.

a. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Avec une anse de platine À proximité du bec Bunsen, à l'aide d'une pince stérile les nodules sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile, dans une boîte de Pétri stérile, jusqu'à l'obtention d'un jus nodulaire de couleur blanchâtre.

Avec une anse de platine flambée puis refroidie, le jus nodulaire est ensemencé sur la surface du milieu Yeast-Mannitol-Agar additionné du rouge congo (YMA-RC) (Annexe 1), ainsi que sur celle du milieu Glucose-Peptone-Agar additionné du pourpre de bromocrésol (GPA-BCP) (Annexe 1).

L'ensemencement est effectué selon la technique des quatre cadrans (figure 11) de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser (Vincent, 1970). Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 28° C pendant 24 à 72h. Un nodule non écrasé est ensemencé sur une boîte de YMA+RC afin d'affirmer la bonne stérilisation des nodules.

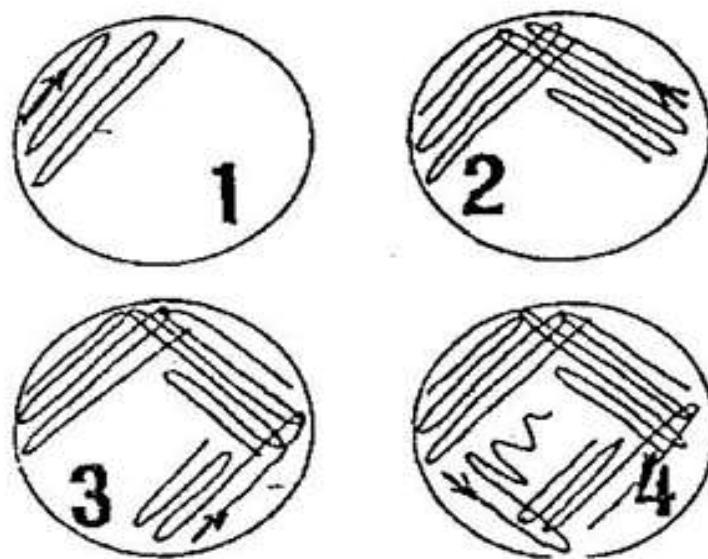


Figure 13: Méthode d'ensemencement des quatre cadrans (Vincent, 1970).

3. Caractères morphologique et culturaux

3-1. Principaux milieux de culture utilisés

Dans le cadre de l'isolement et de l'identification des bactéries nodulants les légumineuses, le choix du milieu de culture constitue une étape essentielle de la première phase expérimentale. Les milieux de culture utilisés doivent non seulement contenir les sources d'énergie nécessaires à la croissance des bactéries ciblées, mais aussi favoriser une identification précise des souches. La composition de ces milieux, exprimée en grammes par litre d'eau distillée, (Annexe 1).

A - Les milieux solides

YMA (Yeast Mannitol Agar).

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo).

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar + Bromocrésol Pourpre).

YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).

B - Le milieu liquide

YMB (Yeast Mannitol Broth).

L'autoclavage des milieux se fait à 120° C pendant 20 minutes.

Les boites sont incubées à 28° C pendant 72h.

3-2. Purification des isolats

Après identification des isolats selon leurs caractères morphologiques, par culture sur le milieu YMA+RC (Annexe 1). Chacune des colonies a été repiquée afin d'être purifiée.

3-2. Examen microscopique

3-2-1. Coloration de Gram

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé une coloration de Gram (Annexe 2), une méthode couramment utilisée en microbiologie pour mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne.

Cette technique permet de classer les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries dites Gram positives et celles dites Gram négatives (Tortora, 2003).

4. Conservation des isolats

4-1. Conservation à court terme

La conservation des isolats se réalise sur un milieu YMA (Annexe 1) tamponné avec du CaCO₃ (3g/l), agissant comme agent neutralisant de l'acidité. L'ensemencement est effectué dans des tubes inclinés, A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 28° C pendant 72h, les tubes sont conservés à 4° C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

4-2. Conservation à long terme

Cette méthode permet la conservation des souches pendant plusieurs mois.

- Ensemencer une colonie pure de rhizobium dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon YMB et les incuber à 28° C jusqu'à l'apparition d'une turbidité.
- Addition de 5 ml d'une solution de glycérol stérile afin d'éviter la congélation des cellules bactériennes.
- Verser le milieu + glycérol dans des tubes Eppendorf stériles.
- Stockage dans des boîtes spéciales et étiquetées.
- Congélation à une température de -20° C (Shetta *et al.*, 2011).

5. Tests biochimiques

5-1. Test de catalase

La recherche de cette enzyme constitue une étape essentielle dans l'identification des bactéries pures. Pour ce test, une goutte d'eau oxygénée est disposée sur une lame stérile, puis mise en contact avec une colonie bactérienne. La présence de catalase, indiquée par le dégagement de bulles d'air (Camille, 2007).

5-2. Test d'oxydase

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



A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, une colonie est prélevée et déposée sur un disque oxydase.

5.3. Test du Mannitol-mobilité

Ce teste permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

À l'aide d'une pipette pasteur l'ensemencement des isolats est réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu Mannitol-mobilité puis incubée à 28° C pendant 48h.

5-4. Recherche de l'enzyme nitrate réductase

Cette étude consiste à mettre en évidence la production d'une enzyme : le nitrate réductase par les bactéries. Nos isolats sont cultivés sur le bouillon TY (Annexe 1) contenant 0,2 % de KNO₃ (p/v), et sont incubés pendant 2 à 4 jours à 28° C.

Après la période d'incubation quelques gouttes des réactifs 1 et 2 du nitrate réductase sont ajoutés au milieu.

5-5. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence l'activité uréasique, les isolats à tester sont ensemencées sur milieu YMA (annexe 1) contenant 2 % d'urée (p/v) et 0.012 g/l du rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu solide sans l'urée est stérilisé à l'autoclave puis refroidi jusqu'à environ 45° C. La solution d'urée est stérilisée par filtration ($\varnothing=0.45\mu\text{m}$) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubées les boites ensemencées à 28° C pendant 72h.

5-6. Activité cellulosique

L'enzyme carboxyméthylcellulase endo β-1,4-Dglucanase ou (CMCase) est l'une parmi les enzymes qui peuvent être synthétisées par les bactéries nodulants les légumineuses (BNL). La présence d'une activité endoglucanasique est mise en évidence dans le milieu YMA contenant 0,25 % (p/v) de CMC. Après 5 jours d'incubation à 28° C, les boites sont rincées avec l'eau courante puis inondées d'une solution de RC (1mg/ml) et incubées à l'étuve pendant 30 min à 28° C, le colorant est ensuite remplacé par une solution de NaCl 1M. Les boites sont ensuite abandonnées à une température ambiante du laboratoire pendant

30 min. Un halo jaune orangé entourant les colonies indique la présence de l'enzyme (Struffi *et al.*, 1998).

6. Tests physiologiques

6-1. Température de croissance

Les bactéries ont été mises en culture sur le milieu YMA afin d'évaluer l'effet de la température sur leur croissance et leur survie.

Les boites ont été incubées à 4° C, 28° C, 37° C et 45° C pendant une durée variant de 24h jusqu'à 7jours.

6-2. Croissance à différentes valeurs du pH

- Les isolats ont été testés pour leur tolérance aux variations de pH sur le milieu YMB, ajusté aux valeurs : 1- 4- 6,8- 8 et 10.
- Chaque tube a été inoculé avec 100 µl de suspension bactérienne, présentant une opacité de 0,5 sur l'échelle de McFarland.
- Après une incubation de 24h à 28° C, la mesure de la densité optique (DO) a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (SHIMADZU, UV-1800).

6-3. Effet de NaCl

Les isolats ont été cultivés sur le milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl (1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %). (171mM, 342mM, 513mM, 855 Mm, 1710mM).

L'ensemencement a été effectué à partir d'une suspension bactérienne ayant une opacité de 0,5 sur l'échelle de McFarland. L'incubation s'est déroulée à 28° C pendant 48h.

7. Étude du profil d'assimilation des sucres des isolats à l'aide de galerie API 20E

7-1. Principe

La galerie API 20E bio-Mérieux est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif.

La galerie biochimique API 20E est composée de 20 microtubes (surmontés de cupules) contenant des substrats déshydratés, qui permettent de réaliser 21 tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique (Camille, 2007). Ces microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (opacité 0,5 sur l'échelle de Mc Ferland).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs (Boukhatem, 2013).

7-2. Technique

7-2-1. Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boite d'incubation

7-2-2. Préparation de l'inoculum

Une suspension bactérienne est préparée dans une ampoule de suspension medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie bien isolée prélevée sur un milieu gélosé.

7-2-3. Inoculation de la galerie

Les galeries doivent être ensemencées en suivant les instructions de Bio-Mérieux. La suspension bactérienne préparée a été introduite dans chaque microtube à l'aide d'une micropipette ou la pointe de l'embout est appuyée sur le côté intérieur pour éviter la formation de bulles d'air. Les microtubes des tests CIT, VP, GEL ont été remplis par l'inoculum jusqu'à la cupule alors que les microtubes correspondent aux tests : ADH, LDC,

ODC, H₂S, URE ont été remplis par la suspension bactérienne et recouverts par une couche d'huile de vaseline pour assurer les conditions d'anaérobiose (figure 12).

Les réactions produites après une incubation de 18-24h à 37° C se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.



Figure 14: La galerie API 20E.

Résultats et discussion

Dans cette étude, un total de douze isolats bactériens, a été obtenus à partir des nodules racinaires de la plante *Ononis* L. collectées dans la wilaya de Boussaâda (tableau 1).

Les nodosités ont été prélevées sur deux espèces végétales distinctes : *Ononis angustissima* L. et *Ononis serrata* Forsk. sur l'ensemble des isolats obtenus, dix ont été utilisés pour la suite des tests.

Tableau 1: Les souches isolées et étudiés.

Espèce végétale	Code des isolats	La région (site de collecte)
<i>Ononis angustissima</i>	ON1	
	ON2	
	ON3	Wilaya de Boussaâda
	ON4	
	ON5	
	ON6	
<i>Ononis serrata</i>	OS1	
	OS2	Wilaya de Boussaâda
	OS3	
	OS4	
	OS5	
	OS6	

1. Test de stérilisation

Le test de stérilisation réalisé sur le milieu (YMA+RC) n'a montré aucune croissance microbienne, l'absence de colonies sur la boîte témoin confirme l'efficacité du protocole de stérilisation.

2. Aspect microscopique et macroscopique

2.1. Aspect microscopique

Après coloration de Gram, l'examen microscopique a montré que les isolats présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles à Gram négatif, (figure 13).

La coloration rose observée chez ces bactéries s'explique par la structure de leur paroi cellulaire, constituée d'une fine couche de peptidoglycane entourée de lipopolysaccharides.

Cette composition permet la décoloration du cristal violet lors du passage à l'alcool, suivie de la prise du colorant secondaire, la fuchsine, qui confère la teinte rose caractéristique (Degefou *et al.*, 2018 ; Wulandari *et al.*, 2024).

Cette caractéristique est en accord avec les descriptions classiques du genre *Rhizobium*, qui regroupe des bactéries à Gram négatif, aérobies, non sporulantes et généralement en forme de bacilles (Vincent, 1970).

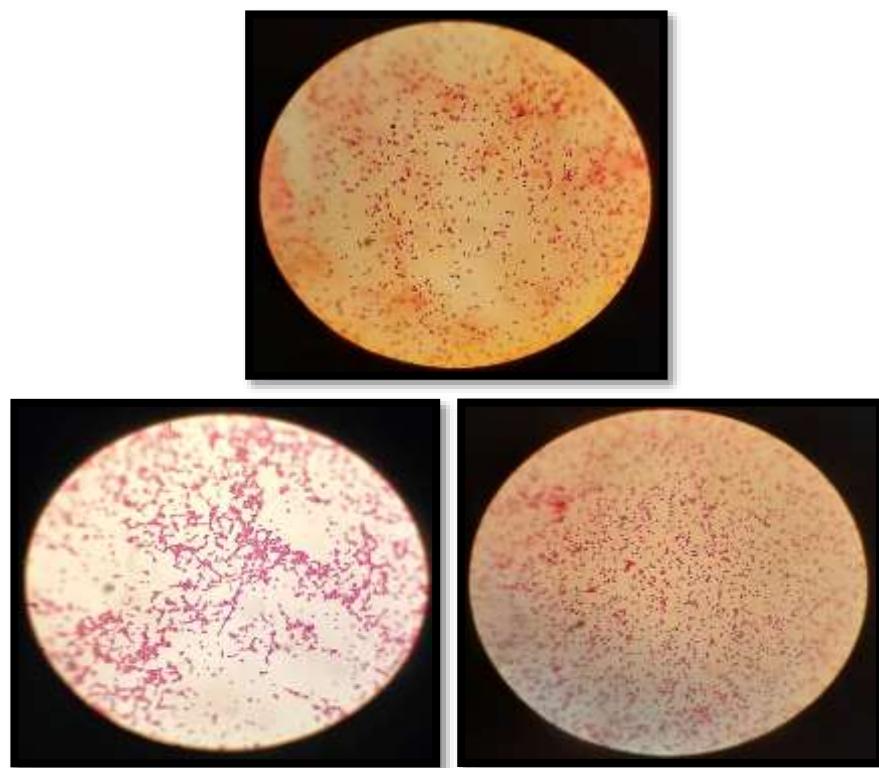


Figure 15: Aspect microscopique des isolats (Objectif X100).

2.2. Croissance sur YMA+ Rouge Congo

La croissance sur le milieu YMA+RC constitue l'un des critères phénotypiques essentiels pour la caractérisation des rhizobiums (Vincent, 1970). La croissance des isolats devient visible après une incubation de 48 à 72h. Les colonies présentent une coloration blanche laiteuse translucide, avec une surface lisse brillante (figure 14). Certains isolats, produisent des exopolysaccharides.

Le genre *Rhizobium* est caractérisé par des colonies qui sont généralement visibles en 48h elles ont une croissance rapide. Les colonies sont blanches ou beiges, circulaires, convexes, semi-translucides ou opaques, élevées et mucilagineuses (Howieson *et al.*, 2016).

Certains isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le rouge congo. Un comportement généralement observé chez la majorité des rhizobia (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984).

Selon Upchurch et Elkan (1977), Zahran *et al.*, (1994), la viscosité des colonies est due à une production massive d'exopolysaccharides qui peuvent avoir un rôle dans la tolérance des souches à la salinité.

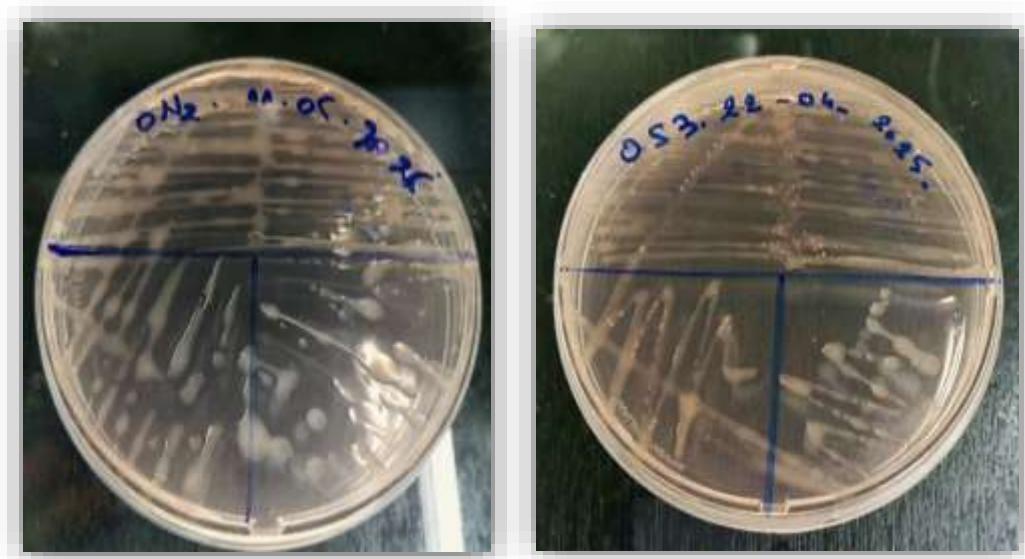


Figure 16: Croissance sur milieu YMA+RC.

2.3. Croissance sur milieu GPA+BCP

L'utilisation du milieu GPA (Glucose Peptone Agar) additionné de BCP (bromocrésol pourpre) comme indicateur de pH permet d'évaluer la capacité des isolats de rhizobia à acidifier leur environnement, indicateur indirect de leur activité métabolique, notamment la production d'acides organiques (Somasegaran et Hoben, 1994).

Dès les 30 premières minutes après l'ensemencement, un changement de couleur localisé autour des colonies vers le jaune a été observé chez presque tous les isolats (figure 15), après 24h d'incubation la croissance de nos isolats provoque une modification du pH et changement de la couleur du milieu du violet vers le jaune.

Ce phénomène traduit une activité métabolique rapide, liée à la production de composés acides lors de la fermentation du glucose par les bactéries.

Ce comportement traduit une activité métabolique rapide, typique de *Rhizobium*, qui est capable d'assimiler diverses sources de carbone et de produire des métabolites acides (Howieson et Dilworth, 2016).

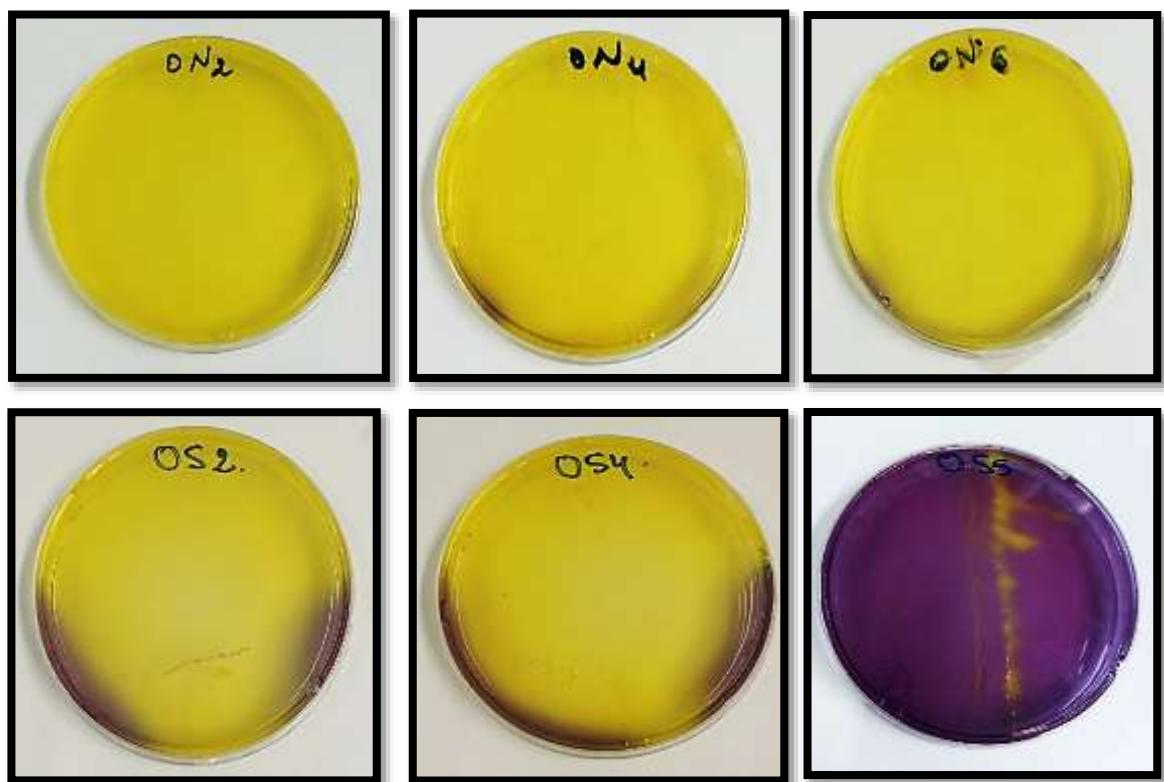


Figure 17: Croissance sur milieu GPA +BCP.

2.4. Croissance sur milieu YMA+BTB

Les isolats incubées pendant 24 à 48h acidifient le milieu et provoquent un virage de la couleur du milieu YMA-BTB de vert vers le jaune, (Figure 16).

Ce virage permet de distinguer les souches à croissance rapide (notamment les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, etc.) qui poussent au bout de 24h d'incubation et virent le milieu vers le jaune, des autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*). Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993).



Figure 18: Croissance sur milieu YMA+BTB.

3. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la majorité des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs, responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en dioxyde de carbone et en eau (Camille, 2007). Selon la réaction suivante :



Tous les isolats ont présenté un test de catalase positive (tableau 2), mis en évidence par la formation rapide de bulles après l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 17), ce qui reflète leur capacité à décomposer le peroxyde via l'enzyme catalase.

Chez les Rhizobiums, cette enzyme joue un rôle important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, protégeant la cellule contre le stress oxydatif. Selon Kwon et An (1999).

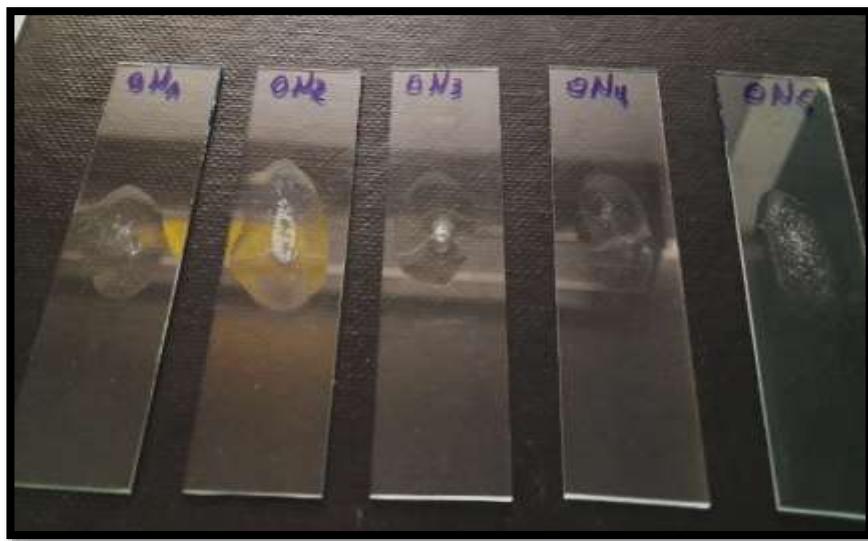


Figure 19: Test de catalase positif.

4. Recherche de l'oxydase

L'oxydase est l'un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée sur le disque surtout celles à Gram négatif (Bendoukhane et Djaaffer, 2016).

Les résultats de l'étude de l'enzyme respiratoire chez nos isolats bactériens ont montré que tous les isolats sont oxydase négatif (figure 18, tableau 2), Ce résultat traduit l'absence de l'enzyme cytochrome c oxydase chez l'ensemble des isolats testés (Cappuccino et Welsh, 2017).



Figure 20 : Test oxydase.

Tableau 2: Résultats des deux tests catalase et oxydase.

Tests \ Isolats	ON1	ON2	ON3	ON5	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5. Test du Mannitol mobilité

Après 48h d'incubation, un envahissement de la gélose à partir du point d'inoculation a été observé chez tous les isolats (figue 19), traduisant leur mobilité active. Par ailleurs, l'ensemble des isolats ont montré une fermentation positive du mannitol (tableau 3), mise en évidence par un changement de couleur du milieu vers le jaune orange, indiquant une acidification résultant de la production d'acides organiques lors de l'utilisation du mannitol comme source de carbone. Les Rhizobiums, en tant que bactéries hétérotrophes, sont connus pour leur capacité à métaboliser divers glucides simples comme le glucose, le saccharose et le mannitol (Shreek *et al.*, 2022).

Tableau 3: Résultats du test de mannitol mobilité.

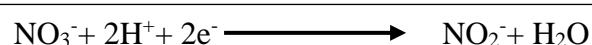
Tests \ Isolats	ON1	ON2	ON3	ON5	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Figure 21 :** Test de mannitol mobilité.

6. Réduction des nitrates

Après 48h d'incubation l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs 1 et 2 du nitrate réductase a montré un virage de la couleur du milieu vers le rouge chez tous les isolats (figure 20).

Ces résultats montrent que tous nos isolats testés réduisent les nitrates en nitrites suite à une activité enzymatique (nitrate-réductase).



Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leurs plantes hôtes (El-Hilali, 2006). La réduction des nitrates ou des nitrites constitue l'un des caractères taxonomiques importants (Joffin et Leyval, 2006).

Lucinski *et al* (2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les Rhizobia dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes.

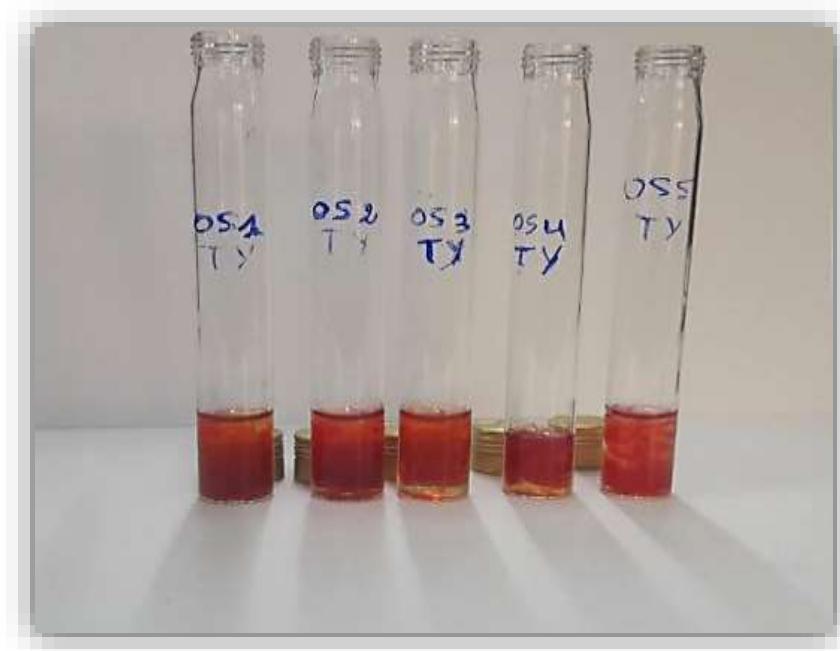


Figure 22 : Réduction des nitrates.

7. Hydrolyse de l'urée

L'activité uréasique est une propriété très répandue dans le monde bactérien et se traduit par la libération de l'ammonium (Mobley, 1992), en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH (El Hilali *et al.*, 2006).

Les résultats du test indiquent une activité uréasique positive pour l'ensemble des isolats. Après 24h d'incubation un début de changement de couleur du milieu vers une teinte rosée a été observé chez la majorité des isolats (figure 21), indiquant la dégradation de l'urée et la libération d'ions ammonium (NH_3) ce qui indique l'alcalinisation du milieu, à l'exception des isolats ON2 et OS5, qui n'ont présenté aucune modification visible à ce stade suggérant une activité enzymatique plus lente ou moins marquée.

Au bout de 72h, tous les isolats, y compris ON2 et OS5, ont montré un virage complet de couleur du milieu, confirmant leur capacité à hydrolyser l'urée selon la réaction qui suit :



La capacité de ces isolats à hydrolyser l'urée reflète leur potentiel métabolique dans la transformation des composés azotés (Peter *et al.*, 2022).

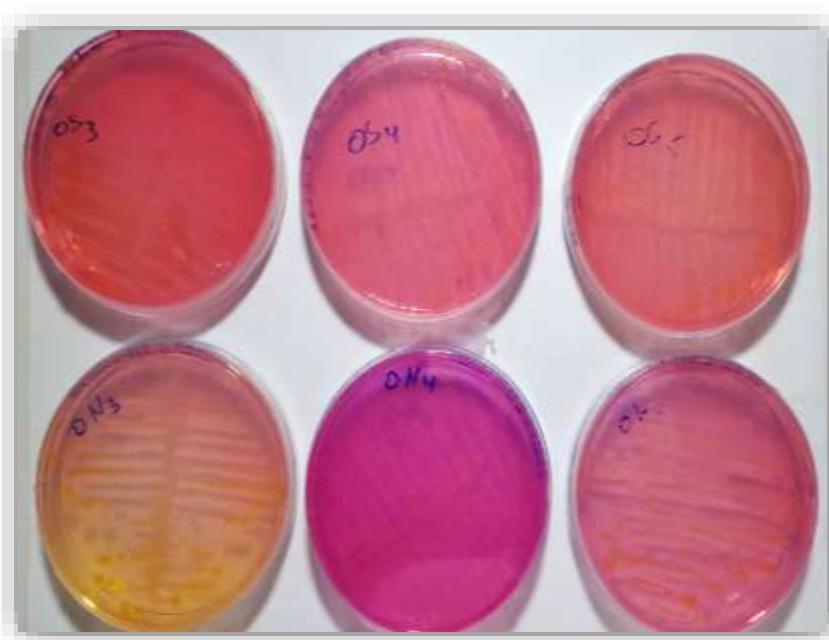


Figure 23: Test d'uréase.

8. Activité cellulosique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose, la présence d'un halo jaune orangé autour des colonies prouve la présence d'un endo β 1-4 glucanase, mise en évidence par hydrolyse du carboxy-méthyl cellulose (CMC) suite à l'addition de NaCl et après rinçage.

L'observation d'un halo clair autour des colonies chez tous nos isolats (figure 22) révèle leur activité cellulolytique indiquant leur capacité à hydrolyser la cellulose.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Zhang et Amelung, 1996), qui mis en évidence que les rhizobiums produit des cellulases, qui dégradent les liaisons glucidiques de la paroi cellulaire végétale, favorisant ainsi la pénétration des bactéries à travers les microfibres de la membrane cellulaire

(José *et al.*, 2001) ont confirmé que l'activité cellulolytique est présente chez l'ensemble des microsymbiontes appartenant aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

(Baumberger *et al.*, 2002) ont confirmé que l'activité de la cellulase est trouvée chez plusieurs espèces rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, et les différentes souches du *R. leguminosarum*.

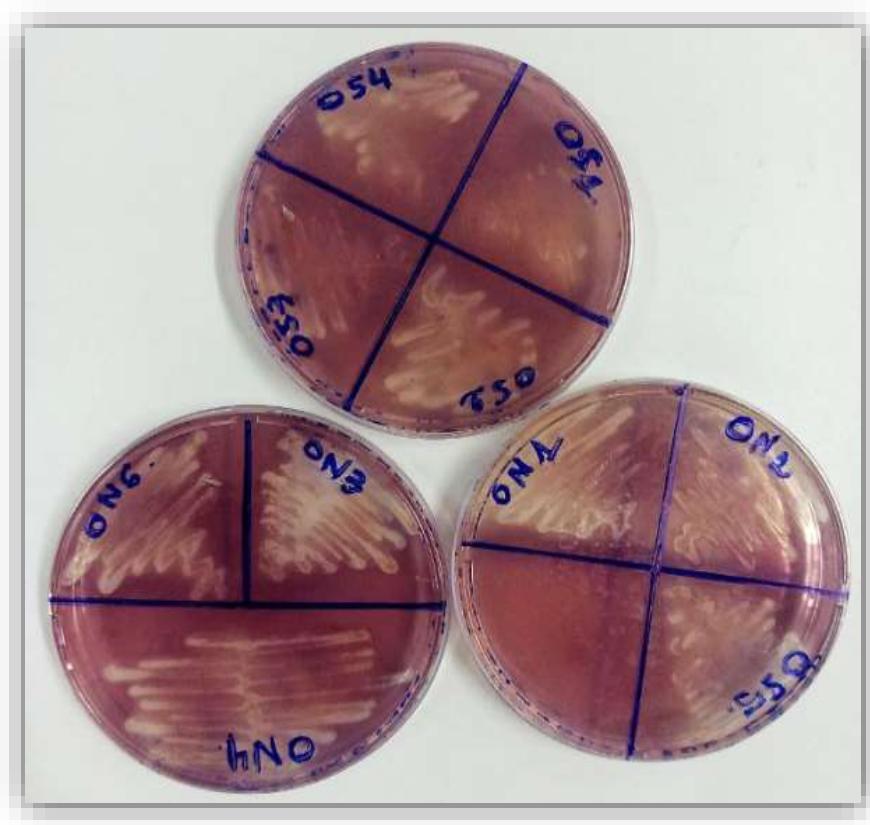


Figure 24: Test de cellulase positif(+).

9. Effet de la température

Après 48h d'incubation sur le milieu YMA, les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des différentes températures allant de 4° C jusqu'à 37° C avec un optimum de croissance à 28° C (Tableau 4, Figure 23).

Tableau 4 : Croissance des isolats à différentes température.

Isolats	T° (C)	4° C		28° C		37° C		45° C	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
ON1	-	++	++	+++	-	-	-	-	-
ON2	-	+	++	+++	-	-	-	-	-
ON3	-	-	+	+++	-	-	-	-	-
ON4	-	+	+	+++	-	+	-	-	-
ON6	-	+	+	+++	-	+	-	-	-
OS1	-	++	++	+++	-	+	-	-	-
OS2	-	++	++	+++	-	-	-	-	-
OS3	-	++	++	+++	+	+	-	-	-
OS4	-	++	++	+++	-	+	-	-	-
OS5	-	++	++	+++	-	+	-	-	-

(-) : pas de Croissance, (+) : faible croissance, (++) : croissance moyenne, (+++) : bonne croissance.

Tous les isolats montrent une absence totale de croissance à 4° C après 24h d'incubation, tandis qu'une croissance modérée à faible apparaît après 48h pour la majorité d'entre eux.

À 28° C, une croissance rapide est observée dès 24h, avec une progression significative à 48h, ce qui indique que cette température se situe dans l'intervalle optimal de croissance

des isolats, d'après les travaux de Nour *et al.* (1994) la température optimale pour la croissance des rhizobia varie généralement entre 28° C et 31° C.

Graham (1992) a rapporté que les rhizobiums sont des bactéries mésophiles et leur température optimale de croissance est 28° C.

À 37° C, aucune croissance n'est observée après 24h, à l'exception de l'isolat OS3 qui présente une faible croissance. Après 48h d'incubation, une croissance modérée est notée juste pour les isolats ON4, ON6, OS1, OS3, OS4 et OS5. Ces résultats suggèrent une capacité différenciée d'adaptation à cette température parmi les isolats.

Il est important de noter que de nombreuses souches rhizobiennes ne peuvent pas se développer à des températures supérieures à 37° C (Graham, 1992 ; Zahran, 1999).

À 45° C, aucune croissance n'a été observée pour l'ensemble des isolats après 24h, 48 h et 7jours d'incubation (figure 23), mettant en évidence leur intolérance aux températures élevées. En effet, ces températures provoquent la déshydratation ainsi que la dégradation des enzymes métaboliques des bactéries (Cloutier *et al.*, 1992).

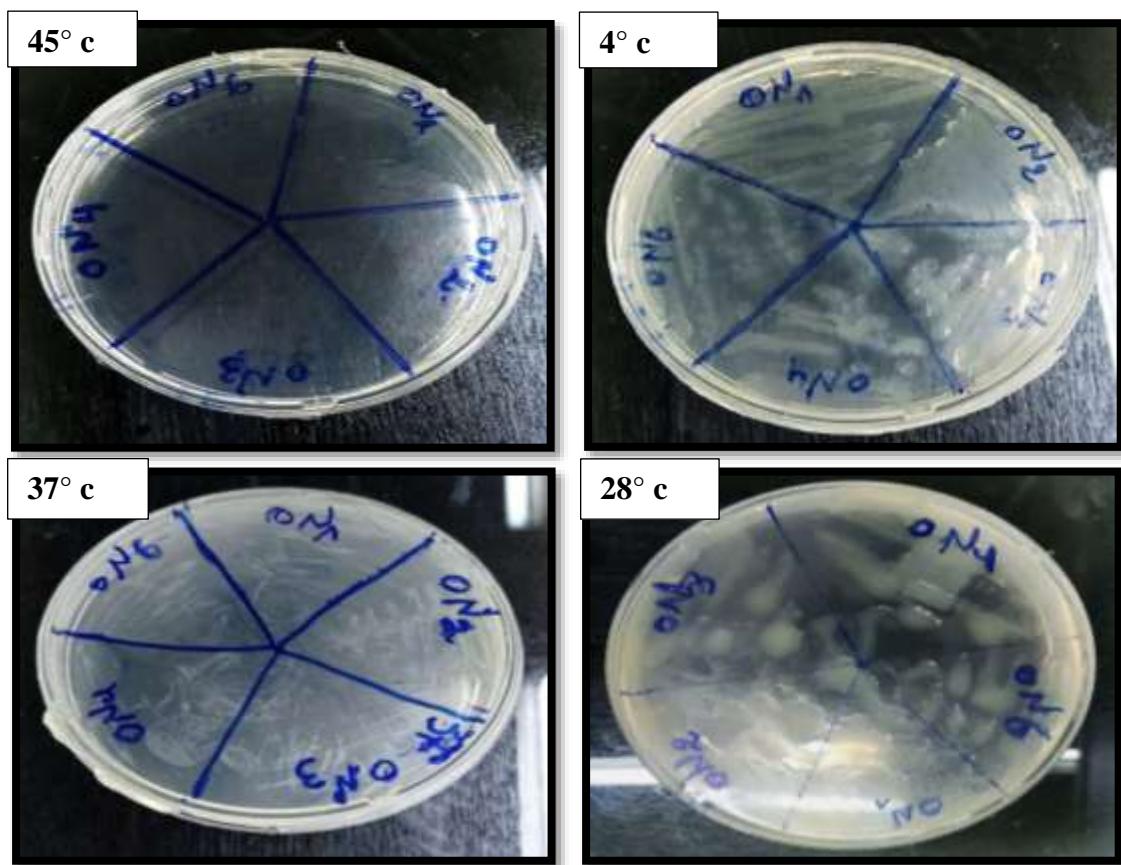


Figure 25: Effet de la température sur la croissance des isolats.

10. Effet du pH

L'étude de l'effet du pH sur la croissance des rhizobiums a révélé une variabilité importante entre les différents isolats testés (figure 24), l'ensemble ont montré une capacité de croissance dans un large intervalle de pH, allant de 4 jusqu'à 10, en accord avec les travaux de Torche (2006), qui indiquaient une tolérance similaire chez la majorité des souches étudiées.

Les résultats obtenus reflètent une diversité des optimums de croissance parmi les isolats, mettant en évidence leur adaptation différentielle face aux variations de pH du milieu.

Après 24h d'incubation, Certains isolats notamment ON2, OS2, OS3, OS4 et OS5, présentent une croissance optimale à pH 10, ce qui permet de les classer parmi les alcalophiles.

D'autres isolats tels que, ON3, ON4 et ON6 montrent une croissance maximale à pH 8, ce qui les positionne comme légèrement alcalophiles.

La tolérance des rhizobiums à des conditions alcalines a été mise en évidence par Jordan (1984), qui a montré que la majorité supporte des pH allant jusqu'à 9. Ce qui correspond au comportement observé chez nos isolats.

L'isolat OS1 atteint sa croissance maximale à pH 6,8, indiquant une préférence pour un milieu neutre. Il s'agit donc d'un isolat neutrophile, Ce résultat est en accord avec les travaux de Brock et Anyango, (1998) et (Ballen *et al.*, 1998) ont montré que les pH optimaux de croissance de *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium etli* sont pH 6,8 et pH 7.

D'après Chabbi (2010), la majorité des souches isolées de la plante légumineuse *Trigonella foenum-graecum* tolèrent un large spectre de pH, compris entre 4 et 10, leur croissance maximale étant enregistrée dans une zone neutre à légèrement acide, entre 6,5 et 7,5.

L'isolat ON1 se distingue par une croissance optimale à pH 4, ce qui suggère une préférence pour les milieux acides. Il peut ainsi être considéré comme acidophile, avec une capacité d'adaptation aux environnements acides.

Rai *et al.* (2012) ont rapporté que les rhizobia à croissance rapide sont capables de se développer à un pH acide, allant jusqu'à pH 4. À pH 1, tous les isolats présentent une

faible croissance. Jordan (1984) a démontré que les souches de rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles aux conditions acides, ce qui pourrait expliquer la diminution de leur développement dans ce milieu très acide.

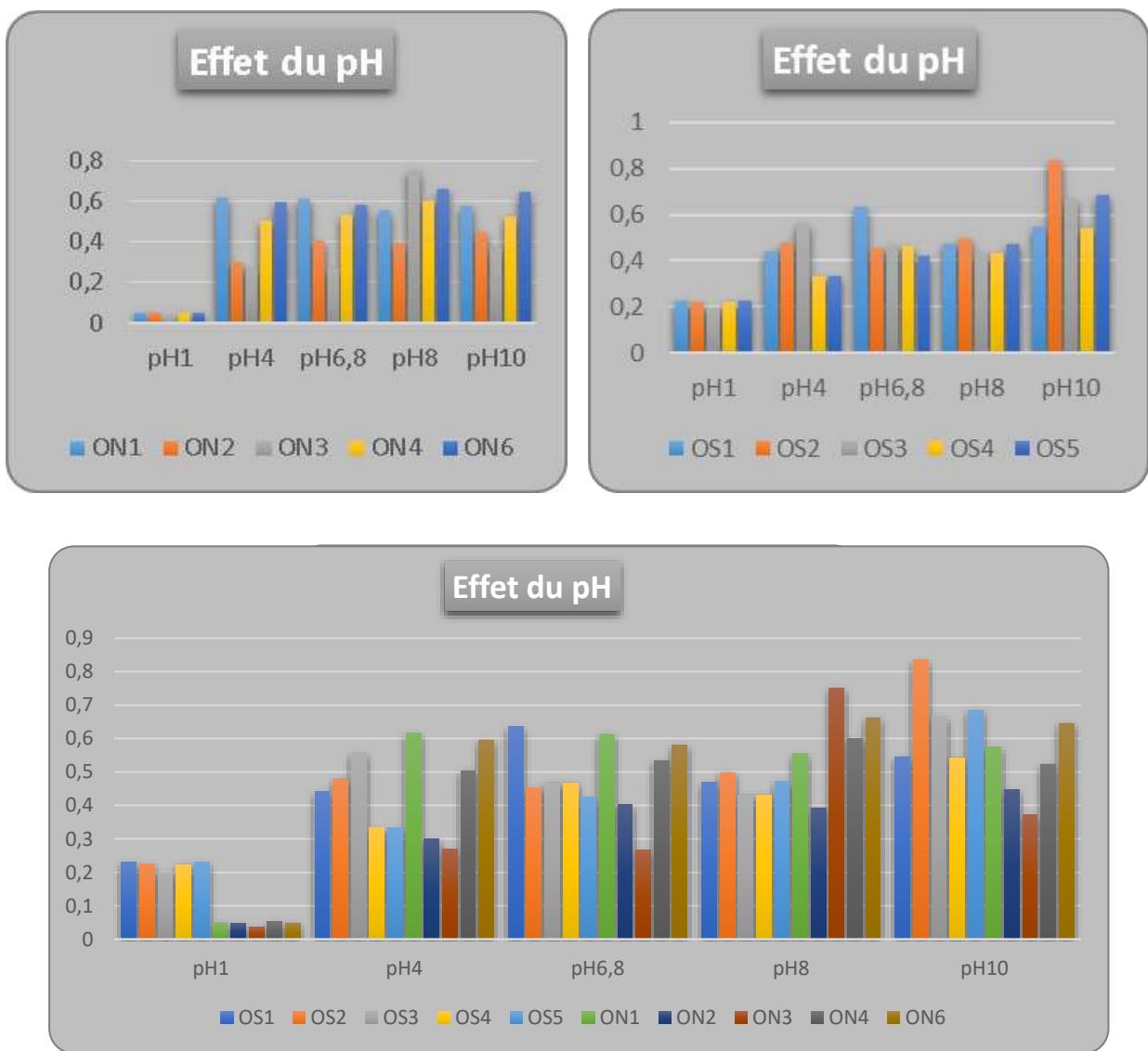


Figure 26: Effet du pH sur la croissance des isolats.

11. Effet de NaCl

Après incubation à 28° C les isolats présentent une tolérance variable aux différentes concentrations de NaCl, avec une bonne croissance observée à 1 % et 2 % (figure 25).

À 3 %, une croissance optimale est observée chez tous les isolats.

À 5 %, une adaptation progressive est observée, la croissance étant retardée mais toujours visible après 2 jours d'incubation pour les isolats OS1, OS2, OS3, OS4 et OS5. Les isolats ON1, ON2, ON3, ON4 et ON6 peuvent croître à la même concentration de NaCl (5 %) Après 5 jours d'incubation à 28° C, illustrant leur capacité à s'adapter aux conditions hyper salines prolongées.

À 10 % de NaCl, pas de croissance chez tous les isolats montre qu'ils atteignent une limite physiologique où leur métabolisme ne peut plus s'adapter au stress osmotique induit par cette forte concentration saline.

Selon les travaux de (Mabiala *et al.*, 2021) certaines souches de rhizobium peuvent tolérer des concentrations de NaCl allant jusqu'à 4 % tandis que d'autres atteignent 5 % et que certaines rhizobactéries se développent même à 7 %. Par ailleurs, certaines études ont démontré que des souches de rhizobium peuvent survivre à des concentrations inférieures à 12 % de NaCl. Ces observations concordent avec nos résultats, qui montrent que les souches analysées dans cette étude ont réussi à croître dans un milieu salin allant de 1 % jusqu'à 5 %.

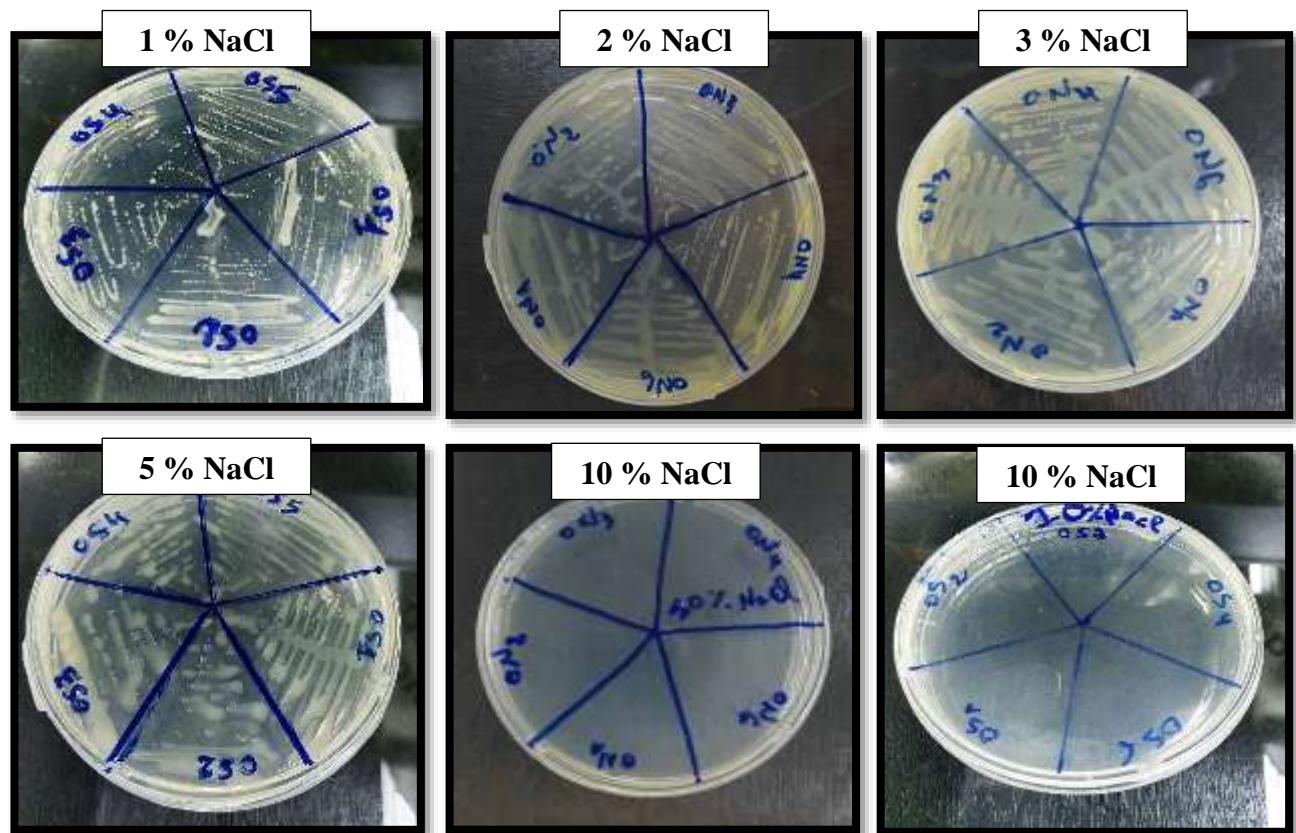


Figure 27 : Effet du NaCl sur croissance des isolats.

12. Galerie API20E

Les résultats de la lecture de la galerie API 20 E, réalisée après une incubation de 24h à 28° C ont permis de déterminer les principaux caractères biochimiques des dix isolats étudiés (figure 26, tableau 5).

Tableau 5: Résultats de la galerie API 20E des isolats étudiés.

Isolats Teste	ON1	ON2	ON3	ON4	ON5	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5
ONPG	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
GEL	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- **Recherche de la β -galactosidase (test ONPG)**

Le test ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) permet de détecter l'activité β -galactosidase chez les bactéries, une enzyme clé impliquée dans l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Dans notre étude, les isolats ON2, ON3, OS1, OS2 et OS3 ont montré un résultat positif au test ONPG, ce qui indique une activité β -galactosidasique fonctionnelle. Cela suggère que ces isolats possèdent le gène lac Z exprimé et actif, responsable de la production de cette enzyme (Madigan *et al.*, 2022).

À l'inverse, les isolats ON1, ON4, ON5, OS4 et OS5 se sont révélés négatifs, ce qui pourrait indiquer soit l'absence du gène lac Z, soit une absence d'induction de son expression dans les conditions expérimentales. Ce type de variation est courant chez les rhizobia, où l'expression des gènes liés au métabolisme du lactose peut dépendre fortement à des conditions environnementales ou de la régulation catabolique (Antoun et Prévost, 2005).

- **Assimilation des sucres comme seule source de carbone**

Après incubation de 24h tous les isolats testés se sont révélés capables de fermenter les sucres : mannitol (MAN), glucose (GLU), inositol (INO), raffinose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amidon (AMY) et arabinose (ARA) (figure 26).

Ce résultat met en évidence un potentiel métabolique étendu chez ces bactéries, leur permettant d'exploiter efficacement un large éventail de sources de carbone.

La capacité à fermenter aussi bien des monosaccharides (glucose, mannitol, inositol, arabinose) que des disaccharides (saccharose, mélibiose), un oligosaccharide (raffinose) et un polysaccharide (amidon) suggère la présence d'un système enzymatique diversifié, capable d'hydrolyser des glucides de complexité variable. Cette diversité enzymatique pourrait représenter un avantage adaptatif dans la rhizosphère, où les ressources carbonées varient selon l'espèce végétale, le stade de développement et les conditions du sol (Antoun et Prévost, 2005).

- **Assimilation des acides aminés comme source d'azote**

Les résultats des tests enzymatiques ADH (arginine dihydrolase), ODC (ornithine décarboxylase) et LDC (lysine décarboxylase) indiquent une absence générale d'activité décarboxylasique chez la majorité des isolats étudiés (figure 28), à l'exception de l'isolat OS3, qui présente une activité positive pour l'arginine dihydrolase. Cette observation suggère que seul cet isolat dispose des gènes exprimés et fonctionnels codant pour l'enzyme spécifique à la décarboxylation de l'arginine, réaction qui aboutit à la production d'agmatine,

un composé potentiellement impliqué dans des mécanismes de régulation du pH intracellulaire ou de résistance au stress (Bernan et Greenstein, 1993 ; Madigan *et al.*, 2022).

L'absence d'activité ODC et LDC chez l'ensemble des isolats testés pourrait traduire une spécialisation métabolique ou une perte fonctionnelle de ces voies dans le contexte écologique des souches isolées. Dans certaines bactéries rhizosphériques, ces enzymes jouent un rôle secondaire mais non négligeable dans l'adaptation aux conditions acides ou dans la modulation des interactions hôte-microorganisme (Antoun et Prévost, 2005 ; Garrity, 2005).

Le profil particulier de l'isolat OS3 pourrait indiquer une variabilité intra-spécifique notable (Brenner *et al.*, 2005). Reflétant soit une divergence génétique, soit une adaptation environnementale particulière.



Figure 28: Résultats des galeries API 20E.

Conclusion

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et établies entre des bactéries qui colonisent les racines des plantes légumineuses.

Dans ce travail nous avons essayé d'isoler et caractériser dix souches bactériennes issues des nodules des plantes légumineuses du genre *Ononis* L. poussées dans la région de Boussaâda.

L'analyse des caractéristiques culturales et cellulaires a montré que les isolats forment des colonies blanches, laiteuse translucide, avec une surface lisse brillante. Les cellules observées présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles à Gram négatif. Parmi l'ensemble des isolats, certaines se distinguent par leur capacité à produire des exopolysaccharides.

Tous les isolats ont une faible absorption de rouge congo, acidifient le milieu GPA et ont une croissance rapide sur le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol.

Les isolats sont mobiles et fermentent le mannitol. Elles sont toutes catalase positives et oxydase négatif.

L'étude de l'effet des conditions environnementales influençant la croissance des souches isolées a montré que la température optimale est de 28° C, aucune croissance n'a été observée à 45° C, ce qui indique une sensibilité à des températures élevées. Les isolats ont montré une diversité des optimums de croissance en fonction du pH, avec une tolérance allant de 4 jusqu'à 10. En ce qui concerne la salinité, une bonne croissance a été observée à des concentrations de NaCl de 1 % et 2 %, aussi tous nos isolats se sont révélées capables de tolérer jusqu'à 5 % de NaCl indiquant leur adaptation au stresse salin.

L'étude du profil d'assimilation des sucres a montré que tous les isolats sont capables de métaboliser l'ensemble des sucres testés, à l'exception du sorbitol. Ces résultats révèlent un potentiel métabolique diversifié, traduisant une bonne capacité d'adaptation aux conditions variables de la rhizosphère.

Les résultats obtenus pour nos isolats renforcent leur appartenance phénotypique au groupe des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (Rhizobia).

Afin de confirmer la capacité symbiotique des isolats, la réalisation de tests de nodulation (bio-inoculant) en conditions contrôlées constitue une étape essentielle. Ces tests permettront de vérifier l'aptitude de chaque isolat à induire la formation de nodules sur des plantes du genre *Ononis* L. réduisant ainsi le recours aux engrains chimiques. Leur valorisation pourrait contribuer à une agriculture durable dans la région de Boussaâda

Le profil particulier de l'isolat OS3, seul à exprimer l'arginine dihydrolase (ADH) au sein de la population étudiée, reflétant une capacité métabolique particulière en lien avec des conditions environnementales spécifiques. Cette caractéristique pourrait être exploitée pour des applications biotechnologiques, telles que la valorisation de composés carbonés ou l'étude de la diversité fonctionnelle au sein des Rhizobia. Une caractérisation moléculaire plus poussée permettrait de mieux comprendre son potentiel et son positionnement phylogénétique.

Les résultats de cette étude mériteraient d'être approfondis et validés par des approches moléculaires dans le cadre de travaux ultérieurs sur les plantes légumineuses de la région de Boussaâda.

*Références
bibliographiques*

- Abbé (2011). Description botanique d'une plante annuelle à pubescence glanduleuse. *Tela Botanica* [en ligne], (consulté le 25 mai 2025), botanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&niveau=2&module=pdf.
- Agreste (2008). Bilans d'approvisionnements agroalimentaires 2007-2008. Rapport : Chiffres et donnés agriculture n°209.ministère de l'agriculture, p : 18-20.
- Aissou, M. (2019). Rapport du TP : Cartographie de Bousaâda [Rapport]. Université de M'sila. Consulté Sur:https://www.researchgate.net/publication/344237604_rapport_du_TP_Cartographie_de_Bousaada.
- Antoun, H., Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, pp. 1–38.
- Anyango B., Wilson K., Giller K. (1998). Competition in Kenyan soils between *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain Kim5 and *R. tropici* strain CIAT899 using the *gusA* marker gene. *Plant and Soil* [en ligne], 204, 69–78, (consulté le 13 juin 2025). <https://doi.org/10.1023/A:1004365412197>.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A., Pinto et al., and the Legume Phylogeny Working Group (LPWG). (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66:4477.
- Bakker : Bakker - Bugrane dentée *Ononis serrata* [en ligne] consulter le : 1 juin 2025 : <https://fr-fr.bakker.com/collections/bugrane-dentee-ononis-serrata-lat>.
- Ballen, K.G., Graham, P.H., Jones, R.K., Bowers, J.H., (1998). Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in rhizobium. *Canadien journal of microbiologie* 44. P: 582-587.
- Baumberger I.C., Fraefel N., Gottfert M., Hennecke H., (2002). New Nodw-or Nifaregulated Brady rhizobium japonicum Genes. The Americain Phytopathological Society. MPMI Vol.16, No.4, 2003: 342-351.
- Baumberger I.C., Fraefel N., Gottfert M., Hennecke H., (2002). New Nodw-or Nifaregulated Brady rhizobium japonicum Genes. The Americain Phytopathological Society. MPMI Vol.16, No.4, 2003: 342-351.
- Baumont, R., Bastien, D., Férid, A., Maxin, G., & Niderkorn, V. (2016). Les différents intérêts des légumineuses pour l'alimentation animale. Journées AFPF, Les légumineuses fourragères et prairiales : quoi de neuf ? [En ligne], (consulté le 30 mars 2025). <https://hal.inrae.fr/hal-02743517/document>.
- Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F. (1993). Practical Rhizobium Legume Technology Manual ICARDA. Syria

- Bernhard, A. (2010). The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*, 3(10) [en ligne]. Consulté le 26 mai 2025. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>.
- Berrada H., Fikri-Benbrahim K. (2014). Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal* [en ligne], 4, 616–639, (consulté le 12 mai 2025). <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>.
- Berrada M., Fikri-Benbrahim K. (2014). Taxonomy and phylogeny of rhizobia infecting legumes grown in Morocco. *British Microbiology Research Journal* [en ligne], 4(3), (consulté le 8 mai 2025). <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>.
- Boakye, E.Y., Lawson, I.Y.D., Danso, S.K.A. & Offei, S.K. (2016). Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis* [en ligne], 69(2), (consulté le 11 mai 2025). <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0383-1>.
- Botany.cz : Botany.cz - *Ononis angustissima* [en ligne] consulter le : 1 juin 2025 : <https://botany.cz/cs/ononis-angustissima/>.
- Boukhatem L. (2013). Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentants isolés au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen. Mémoire de master en biologie. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, Algérie, p.20-23-26-31.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Brink B. (2010). Urease Test Protocol. American Society for Microbiology [en ligne], (consulté le 25 mai 2025). <https://asm.org/getattachment/ac4fe214-106d-407c-b6c6-e3bb49ac6ffb/urease-test-protocol-3223.pdf>.
- Camille, D. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire ou de contrôle sanitaire.
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2017). *Microbiology: A Laboratory Manual* (11th Ed.). Pearson Education.
- Chabbi R. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella L.* poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister : Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine, 92 pages.
- Claude A., Christelle C. (2018) Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes. *Innovations Agronomiques* [en ligne], (69), (page consulté le 28/02/2025). <https://hal.science/hal-02058232>.

- Clémentine L. (2013). Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 263p.
- Cloutier J.D., Prévost P., Nadeau M., Antoun H. (1992). Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2846-2853.
- Darrah P., Jones D. L., Kirk G. J. D., Roose T. (2006). Modelling the rhizosphere: à review of methods for ‘upscaling’ to the whole-plant scale. *European Journal of Soil Science* [en ligne], page (57), consultée le 01/03/2025. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2389.2006.00786.x>
- Daubech, B. (2019). Évolution expérimentale d'un symbiose de légumineuse : étude des facteurs génétiques et des forces de sélection qui favorisent ou non l'évolution du mutualisme. Thèse de doctorat : Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 98 pages.
- Degefu, T., Endalkachew, W.M., Adem, M., Fikre, A., Amede, T et Ojiewo, C. (2018). Morphophysiological diversity of rhizobia nodulating pigeon pea (Cajans cajan L. Millsap.) growing in Ethiopia. *Academic Journals*, 17(6), 167-177.
- Domergue, O. (2017). Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France. Thèse de doctorat : Écologie microbienne. Université Paris Sciences et Lettres, 157 pages.
- Données Agriculture n° 209. Ministère de l'Agriculture, p : 18-20. Export&action=pdf-export&num_nom=74969
- Dupont, J. (2020). Étude des effets des légumineuses sur la nutrition animale. *Journal of Animal Nutrition and Environmental Management* [en ligne] ,25 (n° 1), (consulté le 29 mars 2025). <http://dx.doi.org/10.5601/jelem.2020.25.1.1953>.
- El-Hilali I., (2006). La symbiose Rhizobium-Lupin Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez Lupinus luteus. Thèse de doctorat. Université Mohammed VAgdal Rabat. Maroc.
- Enviroliteracy Team (2025). What are the 7 steps of the nitrogen cycle? The Environmental Literacy Council, vol. 1 [en ligne]. Consulté le 26 mai 2025. <https://enviroliteracy.org/animals/what-are-the-7-steps-of-the-nitrogen-cycle/>.
- EPPO (2025). *Ononis serrata* (ONOSE). EPPO Global Database [en ligne], (consulté le 11 avril 2025). <https://gd.eppo.int/taxon/ONOSE>.

- Faghire M. (2012). Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse de doctorat : Agro-physiologie et Microbiologie des symbioses. Université Cadi Ayyad, Marrakech, 256 pages.
- Garrity, G.M. (Ed.). (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Part C. Springer.
- Ghribi L., Waffo-Téguo P., Cluzet S., Marchal A., Marques J., Mérillon J.M., Ben Jannet H. (2015). Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters [en ligne], 25, (30 mai 2025). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.084>.
- Giraud E. (2007). Symbiose rhizobium/légumineuse : un nouveau sésame. Médecine/Sciences [en ligne], vol. 23(6-7), (consulté le 25 mai 2025). https://ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/6213/MS_2007_6-7_663.pdf.
- Graham P.H. (1992). Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium and nodulation under adverse soil conditions. Canadian Journal of Microbiology [en ligne], 38(6), (consulté le 23 mai 2025). <https://doi.org/10.1139/m92-079>.
- Graham P.H. & Vance C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiology [en ligne], 131(3), 872–877, (consulté le 23 mai 2025). <https://doi.org/10.1104/pp.017004>.
- Howieson J.G., Dilworth M.J. (2016). Working with Rhizobia. Canberra : Centre australien pour la recherche agricole internationale, p :312 .
https://ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/6213/MS_2007_6-7_663.pdf.
- Jakubowski, H., et Flatt, P. (2025). The Biochemistry of Nitrogen in the Biosphere. Biology LibreTexts [en ligne], vol. 18, consulté le 26 mai 2025. https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Fundamentals_of_Biochemistry_%28Jakubowski_and_Flatt%29/02%3A_Unit_II_Bioenergetics_and_Metabolism/18%3A_Nitrogen_-_Amino_Acid_Catabolism/18.01%3A_The_Biochemistry_of_Nitrogen_in_the_Biosphere.
- Joffin J-N., Leyval Guy., (2006). Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4e édition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.
- Jordan, DC. (1984). *Rhizobiaceae*. In: N.R. Krieg and J.G. Holt editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p:234-245.
- José M., Igual L., Velázquez E., Mateos P.F., Rodríguez-Barrueco C., Cervantes E., Martínez Molina E., (2001) : Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups

- Kwon, S., An, C.S. (1999). Isolation and characterization of catalase Gene from Rhizobium sp.SN4003, a Root Nodule Symbiont of *Canavalia Lineata*. *Molecules and Cells*, 9(1), p : 49-55.
- Lafond J., Pageau D. (2007). Effets nutritionnels et non nutritionnels associés à la présence de légumineuses sur les rendements en grains d'orge et les nitrates du sol. *Canadian Journal of Soil Science*, 87 (4), 445-454.
- Laoufi H. (2016). Contribution à l'étude d'*Ononis angustissima* (Lam. Subsp. *Polyclada* Murb) sur l'hyperglycémie postprandiale chez le rat Wismar : effet sur la digestion et l'absorption intestinale de sucres. Thèse de Doctorat : Biochimie Appliquée. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, 150 pages.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., Wojciechowski, M. F. (2005). L'analyse des taux d'évolution des Leguminosae implique une diversification rapide des lignées au cours du Tertiaire. *Systematic Biology*, 54(4), 530-549.
- Lepinay C. (2013). Étude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Thèse : Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 263 pages.
- Lindström K., Mousavi S.A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology* [en ligne], 13(5), (consulté le 8 mai 2025). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>.
- Liu C.-W et Murray J. D. (2016). The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants* [en ligne], vol. 5(3), (consulté le 24 mai 2025). <https://doi.org/10.3390/plants5030033>.
- Louarn G., Faverjon L., Bijelić Z. & Julier B., (2016). Dynamique de l'azote dans les associations graminées-légumineuses : quels leviers pour valoriser l'azote fixé, *Fourrages*. (226), 135-142.
- Lucinski R, Polcyn W ET Rotayczak L., (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. *Acta Biochimia Polonia*.49 (2), p: 537-546.
- Mabiala, S. T., Goma-Tchimbakala, J., Anomene Eckzechel, N., & Aimé, L. (2021). Isolation and Characterization of Native Rhizobium Strains Nodulating Some Legumes Species in South Brazzaville in Republic of Congo. *Advances in Bioscience and Biotechnology* [en ligne], 12(1), (consulté le 26/05/2025). <https://doi.org/10.4236/abb.2021.121002>.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A. (2022). *Brock Biology of Microorganisms*, 16Th ed. Pearson.

- Masson-Boivin, 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.
- Mezrag, A. (2019). L'étude phytochimique et biologique des métabolismes secondaires de deux espèces de la famille des Fabaceae : *Ononis angustissima* Lam. Var et *Lotus corniculatus* L. Thèse : Chimie. Université Mentouri de Constantine, 291 pages.
- MN Editors (2024). Nitrogen Cycle – Definition, Steps, Importance, Examples. *Biology Notes Online*, vol. 44 [en ligne]. Consulté le 26 mai 2025. <https://biologynotesonline.com/nitrogen-cycle-steps-and-significance/>.
- Mobley, L.T.H. (1992) - Urease microbial. In J. Lederberg's Vol 4. Academic Press. Inc.
- Mueller G.M., Schmit J.P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? *Whatcanwepredict? Biodiversity and Conservation*, (16) p: 1-5.
- Mwajita M.R., Murage H., Tani A., Kahangi E.M. (2013). Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters, Kenya Agricultural Research Institute, (8), p :1-9.
- Nour S.M., Fernandez M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 511-522.
- Ozenda P., (1991). Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris. 3émé Edition, p 663.
- Ozyazici, M. A., Acikbas, S. (2021). The Benefits of Legumes for Agriculture Sustainability. ResearchGate [en ligne], (consulté le 15 mars 2025).
- Peter S. Joseph, Dickson A. Musa, Evans C. Egwim et A. Uthman. (2022). Function of Urease in Plants with Reference to Legumes: A Review. *Legumes Research - Volume 2* [en ligne], (consulté le 25 mai 2025). <https://www.intechopen.com/chapters/81535>.
- Phylogeny Working Group (LPWG). (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66:4477.
- Pointereau, P. (2015). Les légumineuses et leur rôle dans la production animale durable. HAL Archives [en ligne], (consulté le 29 mars 2025). <https://hal.science/hal-01202677/file/C44Pointereau.pdf>.
- Quezel, P. et Santa, S. (1962). *Ononis serrata*. Dans : Quezel, P. et Santa, S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Tome 1. Paris : Centre National de la Recherche Scientifique, p. 483.
- Rahimi I., Fetimi F. (2022). Effets des PGPR et les méthodes utilisées pour leur caractérisation. Mémoire de Master : Ecologie microbienne. Université Frères Mentouri Constantine 1. 58p.

- Rahmani S. (2018). Effet de l'anthracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) sur le rendement et ses composantes en zone semi-aride. Thèse de Magister : Agronomie. Université Ferhat Abbas, Sétif, 93 pages.
- Rai R., Dash P.K., Mohapatra T., Singh A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. Indian Journal of Experimental Biology [en ligne], 50(5), (consulté le 4 juin 2025). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22803324>.
- Roger P., (1996). La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement. Conférence débat de l'ORSTOM. Paris Xe France.
- Sanchez J.-M. (2017). Légumineuse + Bactérie Rhizobium = Symbiose. A2C - Agriculture de Conservation [en ligne], consulté le 14 avril 2025. <https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-Bacterie-Rhizobium-Symbiose.html>.
- Santoro D., Passantino A., Ricciardi C.A., Savica V., Bellinghieri G. (2013). Diuretics in the “Istituzioni di Materia Medica e Terapeutica” (1862–1864) by Giovanni Pagano of Naples. JNEPHROL, 26(Suppl 22), S139–S142.
- Seshadri B, Bolan N S, Naidu R. (2015). Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability and remediation, Centre for Environmental Risk Assessment and Remediation, University of South Australia, M Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15(2), p: 524-548.
- Shetta, N.D., Al-Shaharani, T.S et Abdel-aal, M. (2011). Identification and Characterization of Rhizobium associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. American-Eurasian J. Agric & Environ.Sci, 10(3), 410-418.
- Shreek.S., Prasad, N., Prakruthi, G., Siddaligeshwara, K.G et Patil, S.J. (2022). Isolation, biochemical characterization of Rhizobium Sp. Strain SN 01 from root nodules of *Mimosa pudica* and their impact on agricultural crops. Asian Journal of Biological and Life Sciences, 11(1), 200-205.
- Smith S E., Read D.J. (2008). Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Academic press, san diengo, 16- 32p.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1985). Methods in Legume- Rhizobium Technology. USA: United States Agency for International Development (USAID).
 - Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia : guide pratique pour l'étude des rhizobiums. Berlin : Springer-Verlag. 300 p. – (Collection Microbiologie appliquée)
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route towards a Sustainable

- Agriculture. Plants [en ligne], 9(8), (consulté le 25/05/2025).
<https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1816-1822.1992>.
- Sprent, J. I. (2009). Legume nodulation: a global perspective. Wiley-Blackwell. Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O. 2007. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume
 - Struffi, P., V. Corich ; A. Giacomini ; A. Benguedouar ; A. Squartini ; S. Casella ; M.P. Nuti. (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.*, (84), p: 81-89.
 - Süntar İ., Baldemir A., Coşkun M., Keleş H., Küpeli Akkol E. (2011). Annual and perennial legumes: Comparing their secondary metabolism and ecophysiological traits. *Industrial Crops and Products* [en ligne], 34(1), (30 mai 2025).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874111001085>.
 - Teresa M.S., Goma-Tchimbakala J., Eckzechel N.S.A., Aimé L.A. (2021). Isolation and Characterization of Native Rhizobium Strains Nodulating Some Legumes Species in South Brazzaville in Republic of Congo. *Advances in Bioscience and Biotechnology* [en ligne], vol. 12(1), (consulté le 25 mai 2025). <https://doi.org/10.4236/abb.2021.121002>.
 - Torche, Asma., (2006). Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les Légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie.166p.
 - Tortora G.J; B.R Funk; C.L Case. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de pages 945.
 - Tumova L., Tuma J., Dolezal M. (2011). Pyrazinecarboxamides as Potential Elicitors of Flavonolignan and Flavonoid Production in *Silybum marianum* and *Ononis arvensis* Cultures in Vitro. *Molecules* [en ligne], 16, (30 mai 2025). <https://www.mdpi.com/1420-3049/16/11/9142>.
 - Upchurch R.G., Elkan G.H. (1977). Comparison of colony morphology, salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, p. 1118–1122.
 - Vance, C. P., Saito, K. (2001). Legumes and Nitrogen Fixation: The Continuing Story. *Plant Physiology* [en ligne], 127(3), (consulté le 14 mars 2025).
<https://doi.org/10.1104/pp.127.3.1105>.
 - Vincent, J.M., (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
 - Voisin A.S., Gestalt F., (2015). Les spécificités de leur fonctionnement agrophysiologique. In colloque « Les légumineuses, pour des systèmes agricoles et alimentaire durable ». Présentation de l'ouvrage » Nutrition azotée et fonctionnement agro physiologique spécifique des légumineuses", Schneider A., Huyghe C., es. Editions Quae. (P.np).

- Wery J. (1985). Relation entre la nutrition azotée et la production chez les légumineuses. Dans : Lemaire G. (éd.). Nutrition azotée des légumineuses. Paris : INRA, p : 213.
- Wogene S, Tibor J, Zoltán M. (2024). Dévoilement de l'importance de la rhizosphère : implications pour la croissance des plantes, la réponse au stress et l'agriculture durable. Physiologie et biochimie végétales [en ligne], 206, (page consulté le 07/03/2025). Dévoilement de l'importance de la rhizosphère : implications pour la croissance des plantes, la réponse au stress et l'agriculture durable - Science Direct.
- Wulandai, D., Baskoro, K., Mahmuudah, Y., Kusmiyati, F., Pratiwi, A.R et Anto, B. (2024). Bio prospecting of Rhizobia as Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential from Root Nodules of Groundnut (*Arachishy pangaea* L.). TRENDS IN SCIENCES, 21(7), p: 7651-7664.
- Yan, J., Han, X. Z., Ji, Z. J., Li, Y., Wang, E. T., Xie, Z. H., & Chen, W. F. (2014). Land use and crop management impacts abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil. Appl. Environ. Microbiol, 80(17), p: 5394-5402.
- Youcef M., Chalard P., Figuérédо G., Marchioni E., Benayache F., Benayache S. (2014). Chemical composition of the essential oil of *Ononis angustissima* (Lam.) Batt. Et Trab. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences [en ligne], 5(5), (30 mai 2025). [https://rjpbc.com/pdf/2014_5 \(5\)/ \[166\].pdf](https://rjpbc.com/pdf/2014_5 (5)/ [166].pdf).
- Zahran, H. H. (2001). Rhizobia from Wild Legumes: Diversity, Taxonomy, Ecology, Nitrogen Fixation and Biotechnology. Journal of Biotechnology, 91, 143-153.
- Zhang X., Amelung W. (1996). Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and galactosamine in soils. Soil Biology & Biochemistry [en ligne], vol. 28(9), (consulté le 25 mai 2025). [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(96\)00059-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00059-4).

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de culture

- Composition du milieu YMB (YeastManitolBroth) en g/l (Somasgaran et Hoben, 1994)

Mannitol..... 10.00

K₂HPO₄ 0.50

MgSO₄7H₂O 0.20

NaCl..... 0.10

Extrait de levure0.50

Eau distillée 1000 ml

pH 6.8

Autoclavage 120° C pendant 20 minutes

- Composition du milieu YMA+ rouge Congo en g/l (Somasgaran et Hoben, 1994)

YMB 1000 ml

Solution stock de rouge congo.10ml

Agar 15

pH 6.8

Autoclavage 120° C pendant 20 minutes

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

- Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970).

YMB..... 1000ml

Agar..... 18

Ph..... 6,8

Autoclavage à 120° C pendant 20 minutes.

- Composition du milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + pourpre de bromocrésol g/l (Vincent, 1970).

Glucose 10

Peptone5

Solution stock de pourpre de bromocrésol. 10ml

Eau distillée..... 1000ml

Agar..... 15

pH 6.8

Autoclavage 120° C pendant 20 minutes. Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol.

- Composition du milieu TY (Tryptone Yeast) en g/l (bouillon) (Camile, 2007).

Treptone..... 5

Extrait de levure 3

KNO₃..... 0.2

pH..... 6.8

Stérilisation à l'autoclave : 15minutes à 120C°.

- Composition du milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l (Camile, 2007).

Treptone..... 5

Extrait de levure 3

KNO₃..... 0.2

pH..... 6.8

Agar 10

Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120° C.

Annexe 2

Coloration de Gram

La préparation est étalée en couche mince sous la hotte, le protocole expérimental consiste à :

- Un frottis, préalablement fixé à la chaleur sous une hotte à flux laminaire, est recouvert de violet de gentiane, un colorant basique, et laissé en contact pendant une minute.
- Rincer légèrement, puis appliquer la solution de lugol pour fixer le colorant. Laisser agir pendant 30 secondes.
- Décolorer le frottis à l'aide d'une solution alcool-acétone, puis éliminer l'excès de décolorant par un rinçage immédiat à l'eau courante.
- Recouvrir le frottis avec de la fushine et laisser agir pendant 1 minute.
- Laver à nouveau à l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant avant d'observer au microscope.
- L'observation a été réalisée au microscope optique à l'objectif $\times 100$ à immersion.

Annexe 3

Résultats des tests physiologiques

Tableau 1 : Résultats de l'effet du pH sur la croissance des bactéries isolées de *Ononis sserrata* et *Ononis angustissima* (DO 600nm)

Isolats	pH1	pH4	pH6, 8	pH8	pH10
ON1	0,049	0,616	0,611	0,555	0,574
ON2	0,047	0,300	0,402	0,392	0,447
ON3	0,037	0,269	0,267	0,751	0,372
ON4	0,052	0,504	0,534	0,600	0,523
ON6	0,048	0,595	0,580	0,661	0,645
OS1	0,230	0,442	0,635	0,469	0,545
OS2	0,224	0,478	0,452	0,498	0,835
OS3	0,198	0,557	0,468	0,432	0,666
OS4	0,223	0,333	0,468	0,432	0,542
OS5	0,230	0,333	0,424	0,472	0,683

Annexe 4

Galerie API 20 E

Tableau 2 : Lecture de la galerie miniaturisé API20E.

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane déaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Pernchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cuve GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Année universitaire : 2024-2025

Présenté par : Belaamouche Aycha

Mekhloufi Fella

Isolement et caractérisation des bactéries nodulants les racines de la plante légumineuse du genre *Ononis* L. poussant dans la région de Boussaâda.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie appliquée.

Les légumineuses ont la particularité de s'associer avec des bactéries du sol appartenant à la famille des (*Rhizobiaceae*). L'objectif de notre travail est d'isoler des bactéries à partir des nodules de deux plantes légumineuses du genre *Ononis* L. prélevées dans la région de Bousaâda. Pour répondre à cet objectif une caractérisation de 10 isolats porté sur une étude morphologique effectuée sur plusieurs milieux de cultures, suivie de tests physiologiques et biochimiques et enfin une étude du profil d'assimilation des sucres des isolats est réalisée à l'aide de mini galeries biochimiques (galerie API 20E). À la base des résultats obtenus les isolats présentent un profil phénotypique similaire à celui des bactéries nodulants les légumineuses (BNL). Toutefois, afin d'identifier précisément leur genre bactérien et de valider leur rôle potentiel en tant que bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, il serait pertinent de compléter cette étude par une analyse moléculaire.

Mots-clés : *Rhizobiacées*, nodules, *Ononis* L. caractérisation, phénotypique, BNL.

Laboratoires de recherche : laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC), Université Constantine 1 frères Mentouri.

Président du jury : Mr Benhizia Yacine (Professeur - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Mr Chabbi Rabah (Maitre-assistant « A » - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinateur : Mme Guergouri Ibtissem (Maitre de conférence « B » - U Constantine 1 Frères Mentouri).