

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité/Option : Microbiologie appliquée

Département : EGE

Thème

Contribution à l'étude de l'interaction plantes légumineuses-Microorganismes dans la région de Guelma

Présenté par :

- **Hezame Fatima Zahra**
- **Zeddouri Bouthaina**
- **Boumaza Norhane**

Devant le jury composé de :

Président :	Boussadia M.I.	MCB	Université de Guelma
Examineur :	Rouaiguia M.	MCB	Université de Guelma
Encadreur :	Torche E.	MCA	Université de Guelma

2022/2023

Remerciements

Nous remercions **Allah** le tout puissant de nous avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce modeste travail.

Dans un premier temps, nous voudrions exprimer toute nos sincères remerciements aux membres du jury : **Mme Boussadia M.I** et **Mme Rouaiguia M** d'avoir accepté d'examiner et de juger notre travail.

Nous voudrions exprimer toute nos reconnaissances à notre encadrante, **Mme Torche Esma** pour sa patience, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa supervision éclairée.

Nous tenons également à remercier **Mr Nedjah** qui nous a aidé pendant la réalisation de ce travail.

Nous désirons également remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, et surtout **Mme Hayatte** pour leurs aides et leurs conseils.

Nous remercions aussi toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Nous voudrions enfin exprimer notre gratitude à nos proches et les remercier de nous avoir soutenu et encouragé pour terminer ce travail.

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance

C'est tout simplement que , Je dédie ce mémoire....

À mon père • **Abderrezak** •, l'homme et l'exemple éternel de ma vie. Merci pour ce que tu m'as apporté, merci de m'avoir aidée à me construire, merci d'être encore à mes côtés chaque jour.

À ma chère mère • **Sissioua** •, la lumière de ma vie et la flamme de mon cœur. Ton soutien et tes prières fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

À ma première amie, ma sœur • **Lina** • la joie de notre vie.

À mon petit prince, mon chère frère • **Zakaria** • le plus beau cadeau que j'ai reçu de la vie.

À mon encadrante • **madame Torche Esma** •, C'était un honneur pour moi d'être sous votre supervision.

Aussi je la dédie pour toute ma famille • **Hezame et Rahab** •

Pour toutes mes amis et sur tous mes chères • **Marwa et Norhane** •

Mon trinôme • **Norhane et Bouthaina** •

À tous mes camarades de promotion.

Tous le respect et l'amour pour vous.

«• **Hezame Fatima Zahra**•»

Dédicaces

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail

A mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection

ma très chère mère « *Sihem* », ma raison de vivre et raison de tout succès dans ma vie
mon cher père « *Nacer* », tu représentes pour moi le symbole du sacrifice et la patience.
Aujourd'hui, grâce à toi, tes efforts et tes prières, ce travail est réalisé.

A ma chère sœur « *Hidaya* »

source de joie et de bonheur, qui m'as toujours encouragé et aider dans tous mes recherches
de mon parcours avec beaucoup de dévouement de tendresse et surtout d'amour et
d'affection, qui ont toujours éclairé mon chemin

Avec mes sentiments d'amour, a mon grand amour mari « *Salim* », Symbole du courage, sa
patience et son aide qui m'ont toujours encouragée

À toutes mes chères amies, *Nour El houda*, *Meriem*, *Haifa*, *Aya*, et *Ahlem*, source d'espoir
et démotivation, avec qui j'ai passé les plus beaux jours de ma vie, je vous aime de tout mon
cœur.

A mes très chères camarades *Zahra* et *Nourhane*

À mon Encadrante **Torche Esma** , qui m'a donné l'occasion de profiter de toutes ses
connaissances et son savoir, ainsi que l'honneur d'être son encadrée .vous êtes ma source
d'inspiration. Sans votre contribution et vos conseils, je n'aurais jamais pu surmonter toutes
les difficultés. Que le bon Dieu vous accorde la santé et le bonheur.

Et à tous les membres de ma famille.

« • *Zeddourí Bouthaina* • »

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes très chers parents qui sont ma source d'amour, de volenté et de courage, et m'ont permis d'être ce qui je suis actuellement. Merci pour leur soutien et affection inconditionnels, tous les sacrifices et que dieu vous garde.

Mon cher Frère : *Ishak*

toute la famille : *Boumaza et Habirech*

Ma grande mère : *Zahra*

A tous mes amis sur tout *Marwa et Zahra*

Aux étudiants de la promotion 2022/2023 et spécialement aux de la spécialité
Microbiologie Appliqué.

Touts les personnes qui participé de loin ou de prés à l'accomplissement de ce travail

Enfin, à mon cher professeur que j'ai eu l'honneur de connaître et de travailler avec
elle, Merci pour tout.

«• *Boumaza Norhane*•»

Liste des abréviations

FBN : Fixation Biologique du Nitrogène

N : Azote

N₂: Diazote

NH₃ : Ammoniac

N₂O : Protoxyde d'azote

NO₂ : Dioxyde d'azote

NO : Monoxyde d'azote

ADN : Acide désoxyribonucléique

NH₄⁺ : Ammonium

NO₃⁻ : Nitrate

pH : Potentiel d'hydrogène

YMA : Yeast Mannitol Agar

H⁺ : Cation hydrogène

e⁻: Électron

ATP : Acide adénosine triphosphorique

ADP : Acide adénosine diphosphate

H₂ : Dihydrogène

kDa : KiloDalton

API : Analytical Profile Index

API 20E : Analytical Profile Index 20
Entérobactéries

API 20NE : Analytical Profile Index 20
Non Entérobactéries

CaCl₂ : Chlorure de calcium

HgCl₂ : Chlorure de mercure

YMA-RC : Yeast Mannitol Agar + Rouge
Congo

GPA-BCP : Glucose Peptone Agar +
Pourpre de Bromocrésol

h : heure

YMB : Yeast Mannitol Broth

GPA-BTB : Glucose Peptone Agar + Bleu
de Bromothymol

+ : Positif

- : Négatif

nm : Nanomètre

NaCl : Chlorure de Sodium

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Liste Des Figures

Figure 1: Représentation schématique de la rhizosphère.....	4
Figure 2: Cycle de l'azote.....	6
Figure 3: Plant légumineuse <i>Scorpiurus</i>	9
Figure 4: Plant légumineuse <i>Melilotus</i>	10
Figure 5: Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B).	20
Figure 6: Formation des nodules fixateurs d'azote	22
Figure 7: Localisation géographique du zone de prélèvement	24
Figure 8: (a) Plante légumineuse <i>Scorpiurus</i> (b) Plante légumineuse <i>Scorpiurus</i>	25
Figure 9: (a) Racines du plante <i>Scorpiurus</i> avec nodules (b) Racines du plante <i>Melilotus</i> avec nodules	26
Figure 10: Nodules prêt à être utilisées ou conservés.....	26
Figure 11: Conservation des nodules sous CaCl ₂	27
Figure 12 : Illustration de galerie biochimique API 20 E.	31
Figure 13: Illustration d'un tubule.	31
Figure 14: Galeries API 20 E après ensemencement.....	32
Figure 15: Galeries API 20 NE après ensemencement.....	33
Figure 16 : Croissance des souches isolées sur milieu YMA.....	34
Figure 17: Croissance des souches isolées sur milieu YMA-RC.....	35
Figure 18 : Croissance des souches isolées sur milieu YMB.....	36
Figure 19 : Croissance des souches isolées sur milieu YMA+BTB.....	37
Figure 20 : Croissance des souches isolées sur milieu GPA+BCP.....	37
Figure 21 : Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100).	38
Figure 22 : Croissance à différentes valeurs du pH.....	40
Figure 23 : Croissance à différentes concentration de NaCl.....	41
Figure 24 : Test Mannitol-Mobilité après 24h	41
Figure 25 : Tests catalase et oxydase.....	42
Figure 26 : Résultats des galeries API 20 E.....	44
Figure 27: Résultats des galeries API 20 NE.....	45
Figure 28 : Dendrogramme démontrant le rapprochement taxonomique des isolats	47

Liste Des Tableaux

Tableau 1 : Classification actuelle des Rhizobiums.	12
Tableau 2 : Caractères morphologiques des six isolats.	38
Tableau 3 : Croissance à différentes valeurs de température.....	39
Tableau 4 : Test de Mannitol-Mobilité.....	42
Tableau 5: Les résultats des tests catalase et oxydase.....	43
Tableau 6 : Résultats de la galerie API 20E des souches.....	43
Tableau 7 : Résultats des galeries API 20NE des souches.....	44
Tableau 8 : Souches utilisées dans l'étude statistique	45
Tableau 9 : Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence galeries API 20E	46
Tableau 10 : Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence galeries API 20 NE	46
Tableau 11: Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence galeries API 20E + API 20 NE	46

Résumé

Des bactéries ont été isolées à partir des nodules des plantes légumineuses du genre *Scorpiurus* et *Melilotus* situées dans la région de Guelma. La caractérisation des souches isolées porte sur une étude morphologique suivie par des tests physiologiques, des tests enzymatiques (catalase, oxydase) et le test de mannitol mobilité. Une caractérisation biochimique est réalisée par des mini galeries biochimiques (galerie API 20E et galerie API 20NE). L'analyse numérique est traitée par un logiciel XLstat. Les résultats obtenus démontrent que nos isolats possèdent l'aspect morphologique et physiologiques des *Rhizobia* et se rapprochent biochimiquement aux souches de référence *Rhizobium trifolii* et *Sinorhizobium meliloti*.

Mots clés : Symbiose, *Rhizobium*, *Scorpiurus*, *Melilotus*, Taxonomie.

Summary

Bacteria were isolated from the nodules of leguminous plants of the genus *Scorpiurus* and *Melilotus* located in the Guelma region. The characterization of the isolated strains involves a morphological study followed by physiological tests, enzymatic tests (catalase, oxydase) and the mannitol mobility test. A biochemical characterization is carried out by mini biochemical galleries (API 20E gallery and API 20NE gallery). The numerical analysis is processed by XLstat software. The results obtained demonstrate that our isolates have the morphological and physiological appearance of *Rhizobia* and are biochemically similar to the reference strains *Rhizobium trifolii* and *Sinorhizobium meliloti*.

Keywords: Symbiosis, *Rhizobium*, *Scorpiurus*, *Meliltous*, Taxonomy.

ملخص

تم عزل البكتيريا من عقيدات نباتات بقولية من جنس *Scorpiurus* و *Melilotus* المتواجدة في منطقة قالمة. يشمل تعريف السلالات المعزولة دراسة مورفولوجية متبوعة باختبارات فسيولوجية وأنزيمية (كاتلاز وأوكسيداز) واختبار مانيتول حركة. يتم إجراء التعريف البيوكيميائي بواسطة مجاميع الاختبارات البيوكيميائية المصغرة (API و API 20E) تمت معالجة التحليل الرقمي بواسطة برنامج XLstat. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن عزلاتنا لها المظهر المورفولوجي والفسولوجي للريزوبيا وهي مشابهة بيوكيميائيا للسلالات المرجعية *Rhizobium trifolii* و *Sinorhizobium meliloti*.

الكلمات المفتاحية: *Scorpiurus*، التكافل، الريزوبيا، التصنيف، *Melilotus*.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste Des Figures

Liste Des Tableaux

Résumé

Summary

ملخص

Introduction..... 1

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

1. Sol.....3

1.1. Rhizosphère.....3

2. Azote.....4

2.1. Cycle d'azote5

2.2. Fixation biologique de l'azote6

2.2.1. Les molécules clé de la fixation biologique de l'azote.....7

2.2.1.1. La nitrogénase.....7

2.2.1.2. La léghémoglobine.....7

3. Interaction plantes légumineuses-bactéries7

3.1. Plantes légumineuses8

3.1.1. La légumineuse *Scorpiurus*.....8

3.1.2. La légumineuse *Melilotus*9

3.2. Bactéries "*Rhizobia*"10

3.2.1. Caractères morphologiques.....10

3.2.2. Caractères biochimiques11

3.2.3. Caractères physiologiques11

3.2.4. Caractères cultureux.....11

3.2.5. Classification des *Rhizobia*12

4. Nodulation.....	19
4.1. Dialogue moléculaire	19
4.2. Nodules	19
4.3. Phases de la nodulation.....	20
5. Importance de l'identification biochimique des bactéries	22

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Description de la zone d'étude.....	24
2. Collecte des nodules	24
3. Conservation des nodules	26
4. Isolement des bactéries à partir des nodules	27
4.1. Stérilisation des nodules	27
4.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés.....	27
5. Caractères culturaux.....	28
6. Examen microscopique.....	28
7. Effet des facteurs abiotiques	29
7.1. Température de croissance	29
7.2. Croissance à différentes valeurs du pH.....	29
7.3. Tolérance au NaCl	29
8. Test de Mannitol-mobilité.....	29
9. Test de la catalase.....	30
10. Test de l'oxydase.....	30
11. Caractérisation biochimique des isolats par les galeries API.....	30
11.1. Galerie API 20 E	31
11.2. Galerie API 20 NE	32
11.3. Préparation de la suspension bactérienne 0.5 McFarland	33
12. Analyse statistique	33

Chapitre 3: résultats et discussion

1. Etude morphologique des bactéries isolées à partir des nodules des plantes légumineuses <i>Scorpiurus</i> et <i>Melilotus</i>	34
1.1. Caractères cultureux.....	34
1.1.1. Croissance sur milieu YMA.....	34
1.1.2. Croissance sur milieu YMA-RC	34
1.1.3. Croissance sur milieu YMB.....	35
1.1.4. Croissance sur milieu YMA+BTB.....	36
1.1.5. Croissance sur milieu GPA +BCP.....	37
1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram.....	38
2. Effet des facteurs abiotiques	38
2.1. Température de croissance	38
2.2. Effet du pH.....	39
2.3. Tolérance au NaCl.....	40
3. Test de Mannitol mobilité	41
4. Test de la catalase.....	42
5. Test de l'oxydase.....	42
6. Identification biochimiques	43
6.1. Galeries API 20 E.....	43
6.2. Galerie API 20 NE	44
7. Analyse statistique	45
Conclusion	48
Références bibliographiques.....	49
Annexe	

Introduction

Introduction

L'azote est, avec l'eau, l'un des facteurs limitants les plus fréquents de la production végétale (ONUAA, 1992).

La plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume, est constitué d'azote (N₂ ou diazote), un gaz incolore et inodore. Cependant, malgré son abondance, les plantes supérieures sont incapables de convertir le diazote en une forme biologiquement utilisable. Les deux atomes du diazote sont reliés par une liaison exceptionnellement stable $N \equiv N$ et les plantes ne possèdent pas l'enzyme capable de rompre cette liaison. Seules certaines espèces procaryotes sont capables d'effectuer cette réaction importante. Cette situation pose aux plantes un problème particulier concernant l'absorption et l'assimilation de l'azote (Hopkins et Evrard, 2003).

Les légumineuses font partie des rares espèces capables d'établir des symbioses avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique. Des processus de reconnaissance mutuelle conduisent à la colonisation des racines par les bactéries. Celles-ci sont hébergées dans une structure histologique caractéristique, le nodule. Le principe d'une symbiose est celui d'un bénéfice mutuel aux deux espèces. Dans le cas présent, la bactérie reçoit de la part de la légumineuse l'énergie pour son métabolisme, alors que la plante bénéficie des composés riches en azote que les *Rhizobia* ont fabriqué. L'azote fixé provient de l'atmosphère (Le Chatelier et al, 2016).

Cette symbiose entre les légumineuses et les *Rhizobia* présente ainsi un intérêt écologique et économique [1]. La fixation d'azote par des Bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996).

Les *Rhizobia* sont les bactéries qui forment des symbioses fixatrices d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. Suite à l'adoption de la taxonomie polyphasique comme critère de caractérisation, leur classification a subi de nombreux remaniements ces dernières années. Chaque technique utilisée en taxonomie, y compris la caractérisation de type phénotypique et biochimique, a son propre pouvoir discriminant; leur fiabilité dépend de différents facteurs tels que les variables étudiées, les conditions particulières d'expérimentation, nombre et type de souches étudiées (Zakhia et De Lajudie, 2001).

Notre étude est une approche taxonomique des bactéries isolées à partir des nodules des plantes légumineuses de genres *Melilotus* et *Scorpiurus* situées dans la région de Guelma.

L'étude des bactéries est réalisée par une caractérisation phénotypique qui inclut une étude morphologique, physiologique et biochimique. L'étude biochimique a été réalisée à l'aide de mini-galeries biochimiques pour leur simplicité et leur rapidité, en plus de l'importance des tests réalisés dans la classification.

Ce travail comprend trois principaux chapitres :

- Chapitre I : synthèse bibliographique, ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique.
- Chapitre II : matériel et méthodes, comprend les travaux réalisés en pratique.
- Chapitre III : résultats et discussion.

Et enfin nous avons terminé par une conclusion qui résume l'ensemble de résultats obtenus et les perspectives.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Sol

Le sol est vivant et composé de nombreux micro-organismes, ces derniers représentent une part importante de la matière organique des sols. La santé du sol et l'activité de la rhizosphère dépendent beaucoup de cette activité microbienne. Le sol est un complexe biotique composé de bactéries, de champignons, d'actinomycètes, et de mycorhizes. Ces organismes sont des facteurs essentiels de la pédoplasation des sols et de la qualité du sol. La biomasse microbienne du sol contrôle la matière organique et la santé du sol et les échanges au niveau de la rhizosphère. Elle assure l'assimilation des nitrates, des carbonates, du carbone et la minéralisation et l'immobilisation des nutriments. Les échanges biotiques sont essentiels pour comprendre (Gobat *et al.*, 1998 ; Pomel, 2008).

1.1. Rhizosphère

Le terme rhizosphère (étymologiquement rhiza: racine, sphair: ce qui entoure) a été proposé la première fois en 1904 par un chercheur allemand (Hiltner) pour décrire la zone de sol qui entoure la racine et qui est directement ou indirectement influencée par la racine. La rhizosphère peut être qualifiée de moitié cachée du système racinaire qui est lui-même cryptique (Stengelet et Gelin, 1998).

La communauté scientifique distingue trois parties différentes qui constituent la rhizosphère:

- **L'endorhizosphère ou rhizosphère interne** comprend l'écorce racinaire (tissu situé entre l'endoderme et l'épiderme) envahi par les micro-organismes.
- **Lerhizome** est constitué de la surface des racines et des micro-organismes qui s'y trouvent.
- **L'ectorhizosphère, l'exorhizosphère, le sol rhizosphérique ou la rhizosphère externe** est la partie du sol qui est en contact étroit avec la surface des racines et des plantes [2].

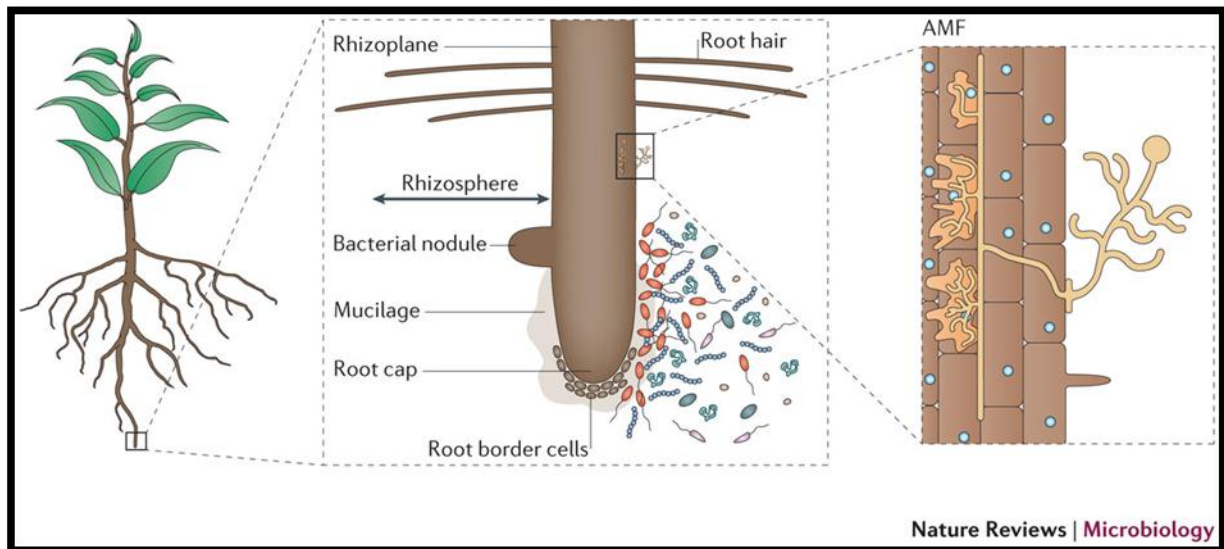


Figure 1: Représentation schématique de la rhizosphère [3].

L'importance de la rhizosphère se trouve dans les interactions qui se reproduisent entre les plantes et le microbiote du sol.

- Au travers de la rhizosphère les plantes récupèrent les nutriments. Il en va de même pour l'eau et le carbone dont les bactéries, les champignons, les insectes, les vers et les protozoaires ont besoin pour survivre.
- La microflore de la rhizosphère protège la racine contre les pathogènes, contre les maladies des racines et produit des substances qui stimulent la croissance des plantes, comme l'acide indole-acétique, les gibbérellines et les cytokinines.
- Se produit la Fixation Biologique du Nitrogène (FBN), c'est-à-dire que les micro-organismes donnent aux plantes des composés azotés assimilables (ammonium et nitrate), qu'ils fabriquent à partir de l'azote atmosphérique dans le sol (N_2) [2].

2. Azote

L'azote atmosphérique (78% en volume) représente la principale source d'azote de la planète. On trouve également dans l'atmosphère, mais en très faible quantité, de l'ammoniac (NH_3) et des oxydes d'azote (N_2O , NO_2 , NO) qui sont les produits des fumées industrielles, des feux de forêt et des activités volcaniques. Les organismes vivants, plantes et animaux peuvent aussi rejeter de faibles quantités de NH_3 , dans l'atmosphère (François et Gaudry, 1997).

L'azote est essentiel pour tous les organismes car il est un élément indispensable des molécules biologiques comme les protéines et les acides nucléiques. A première vue, il semble qu'un manque d'azote pour les organismes soit impossible (Berg et *al.*, 2009).

2.1. Cycle d'azote

Il y a cinq étapes dans le cycle de l'azote, dans lequel celui-ci exécute un cycle entre l'environnement abiotique et les organismes. Ces cinq étapes sont les suivantes : la fixation de l'azote, la nitrification, l'assimilation, l'ammonification et la dénitrification. Les bactéries sont impliquées dans toutes ces étapes à l'exception de l'assimilation (Berg et *al.*, 2009).

- **Fixation de l'azote**

La première étape du cycle, la fixation de l'azote, est la transformation de l'azote gazeux en ammoniac (NH_3). Les bactéries fixatrices d'azote, comme les cyanobactéries, sont responsables de la fixation biologique de l'azote dans le sol et dans les environnements aquatiques. Une autre bactérie fixatrice d'azote importante, le *Rhizobium*, vit dans des nodules, sur les racines de certains légumes comme les haricots, les petits pois et certaines plantes ligneuses. La relation entre le *Rhizobium* et ses plantes-hôtes est réciproque : les bactéries reçoivent des sucres de la plante et la plante reçoit de l'azote sous une forme qu'elle peut utiliser (Berg et *al.*, 2009).

- **Nitrification**

La transformation de l'ammoniac (NH_3) ou de l'ammonium (NH_4^+), formé lorsque l'eau réagit à l'ammoniac en nitrate (NO_3^-) s'appelle la nitrification (Berg et *al.*, 2009).

- **Assimilation**

Les racines de la plante absorbent le nitrate (NO_3^-), l'ammoniac (NH_3) ou l'ammonium (NH_4^+), et assimilent l'azote de ces molécules dans les protéines de la plante et les acides nucléiques (Berg et *al.*, 2009).

- **Ammonification**

L'ammonification est la transformation de composés azotés biologiques en ammoniac (NH_3) et en ammonium (NH_4^+) (Berg et *al.*, 2009).

- **Dénitrification**

La dénitrification est la réduction du nitrate (NO_3^-) en azote gazeux. Les bactéries dénitrifiantes inversent l'action de fixation de l'azote et la nitrification des bactéries restituant l'azote à l'atmosphère (Berg et al., 2009).

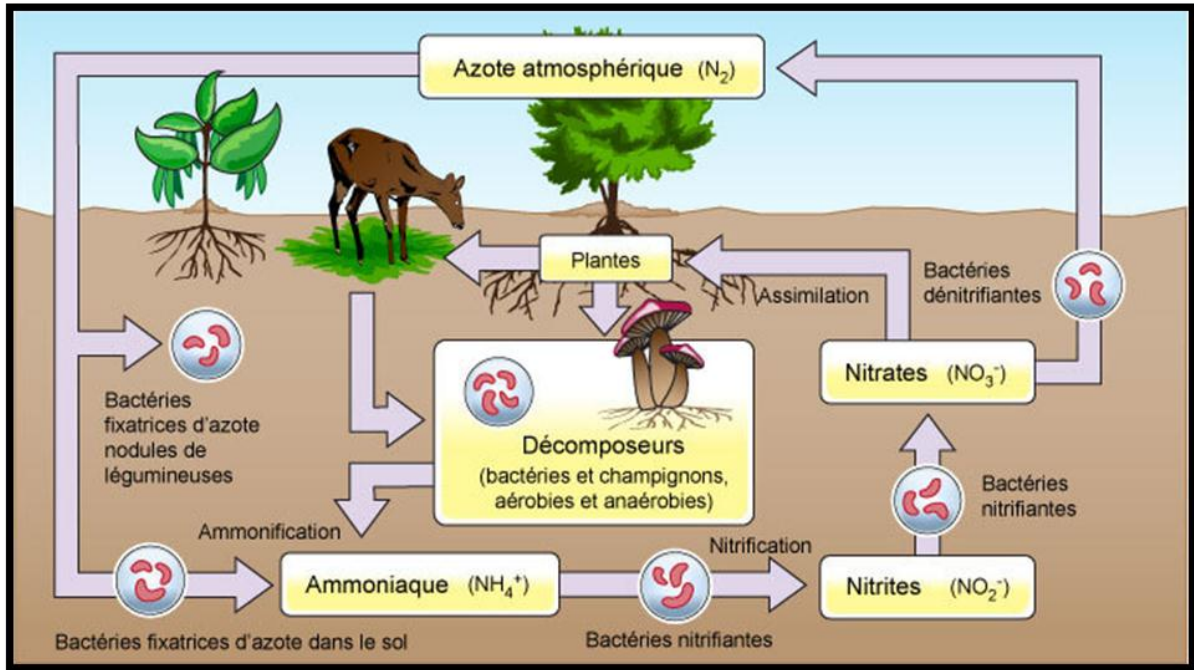


Figure 2: cycle de l'azote [4].

2.2. Fixation biologique de l'azote

Après l'eau et la lumière, c'est le manque d'azote qui limite la croissance des plantes (Suty, 2015), pour devenir assimilable l'azote atmosphérique doit d'abord être transformé (Duperron, 2017).

Les plantes de la famille des légumineuses ont un avantage majeur ; elles ont la capacité d'établir une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*. Au contact des *Rhizobia*, la plante va former de petits organes racinaires, appelés nodules, au sein desquels les bactéries, différenciées en bactéroïdes, vont pouvoir se loger. Les plantes fournissent aux bactéries une niche écologique et des sources de carbone nécessaires à leur développement. En retour les bactéries fixent l'azote atmosphérique et le transfèrent à la plante sous une forme assimilable, l'ammoniac [1].

La capacité des bactéries du genre *Rhizobium* à fixer l'azote au cours de cette symbiose présente un réel intérêt économique et écologique, une solution alternative et/ou complémentaire à l'utilisation d'engrais azotés classiques. Il est généralement admis que les

fixateurs d'azote symbiotiques apportent au sol, une quantité d'azote nettement plus importante que ne le font les bactéries libres. Un hectare d'une légumineuse en symbiose avec *Rhizobium* fixe couramment de 25 à 60 kg d'azote par an, alors que les organismes non symbiotiques fixent moins de 5 kg (Sprent et Sprent, 1990). Il existe plus de 17.000 espèces de légumineuses. Bien que la capacité de former des nodules n'ait été examinée que chez 20% d'entre elles, 90% des espèces étudiées forment des nodules (Hopkins et Evrard, 2003).

2.2.1. Les molécules clé de la fixation biologique de l'azote

2.2.1.1. La nitrogénase

La nitrogénase est une enzyme très conservée tant au niveau biochimique que génétique. Cette enzyme comprend deux métalloprotéines souvent nommées Protéine 2 ou dinitrogénase réductase (homodimère de 64 KDa) et Protéine 1 ou dinitogénase. La dinitogénase, tétramère de 220 KDa. C'est au niveau de la dinitogénase que l'azote moléculaire est réduit en ammoniac tandis que la dinitogénase réductase assure le transfert des électrons libérés par la ferrédoxine (Duhoux et Nicole, 2004).

2.2.1.2. La lèghémoglobine

Dans le nodule, les bactéries comme les cellules végétales respirent et l'oxygène est donc omniprésente. Or les deux composants de la nitrogénase sont irréversiblement inactivés par l'oxygène. Le maintien d'une faible pression partielle en oxygène dans le nodule est donc crucial. Dans le nodule des légumineuses, il est assuré par une barrière à la diffusion de l'oxygène située dans le cortex interne du nodule, par une respiration bactérienne rapide et par la présence de lèghémoglobine, protéine qui facilite le transport de l'oxygène aux bactéroïdes, à une faible pression partielle, sans endommager le complexe nitrogénase. La fixation de l'azote se réalise dans une association symbiotique : l'énergie d'origine photosynthétique est utilisée par les bactéroïdes. En retour, l'azote réduit, excrété par les symbiosomes, est assimilé par la plante et contribue à sa croissance (Duhoux et Nicole, 2004).

3. Interaction plantes légumineuses-bactéries

Les plantes ont besoin d'azote pour se développer. Mais elles ne peuvent pas l'utiliser directement parce que la force de la liaison $N\equiv N$ (944 kJ mol) rendent l'azote presque aussi inerte que les gaz nobles (Atkins et *al.*, 2017).

La nutrition azotée des plantes de la famille des légumineuses est assurée par deux voies complémentaires : absorption de l'azote minéral du sol par les racines, comme chez tous les

végétaux supérieurs, et fixation de l'azote atmosphérique, processus propre à ces espèces, grâce à une symbiose avec des bactéries du sol (Voisin et *al.*, 2015).

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse, décrite pour la première fois par Frank (1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. Elle présente un intérêt agronomique considérable (Aouadj et Saidi, 2015). La symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction des apports d'engrais. L'azote fixé par la symbiose est restitué au sol après la décomposition de la matière végétale (racines, nodules, parties aériennes), ou via les déjections des animaux ayant pâture (Ndiaye, 1996). Les légumineuses sont traditionnellement utilisées comme fourrage (Aouadj et Saidi, 2015).

3.1. Plantes légumineuses

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille botanique des *Fabacées*, qui représente la troisième famille des plantes par le nombre d'espèces à savoir 18000 référencées, après les composées (Asteracées) et les orchidées. Les plantes de la superfamille des *légumineuses* ou *leguminosae* sont très nombreuses, très diversifiées au plan taxonomique avec trois familles (*Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae*).

Les légumineuses sont caractérisées par :

- Des fleurs papilionacées (en forme de papillon) pour la plupart des espèces cultivées.
- Une gousse contenant des graines (la gousse étant le fruit issu de l'ovaire de la fleur).
- Et pour la majorité des membres de cette famille, la capacité d'utiliser l'azote atmosphérique (N_2) pour produire ses propres composants protéiques. Cette capacité est permise par la symbiose avec des bactéries du sol fixatrices de l'azote au sein d'organes spécialisés (les nodules) qui se développent sur les racines (Schneider et *al.*, 2015).

3.1.1. La légumineuse *Scorpiurus*

Scorpiurus est une plante dicotylédone appartenant à la famille des *légumineuse* et la sous famille des *Papilionacées*, et au genre *Scorpiurus*. La classification du *Scorpiurus* étudiée par plusieurs auteurs, indique que jusqu'à nos jours, pas de nomenclature claire concernant ces espèces et reste cependant très confuse, en particulier pour l'espèce *Scorpiurus muricatus* en raison de l'existence d'un polymorphisme morphologique. De ce fait de nombreuses classifications sont proposées se basant essentiellement sur l'étude de caractères morphologiques.

Scorpiurus est une plante annuelle, autogame. Elle présente au stade plantule de grands cotylédons qui prennent l'aspect d'un axe dressé, lancéolé et atténué progressivement en pétiole. Les premières feuilles qualifiées de primordial foliaires sont entières et sont disposées sur un court hypocotyle en rosette lâche. La tige est rampante et dont la taille peut atteindre les 40 à 50 cm de longueur avec un large recouvrement végétal. Les feuilles sont grandes, entières et de forme ovale. La floraison débute vers le mois de mars et s'étend jusqu'à Mai (Fadliet Khemissi, 2017).



Figure 3: Plant légumineuse *Scorpiurus* [5].

3.1.2. La légumineuse *Melilotus*

Melilotus est un genre des légumineuses qui appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionoideae* ; il inclut 25 espèces, caractérisées par des rendements importants en graines, une tolérance aux températures extrêmes et un taux de fixation d'azote supérieur aux autres légumineuses. Le Mélilot jaune est une plante d'origine méditerranéenne, de la famille des *Fabacées*, annuelle rarement vivace, éphémère à feuilles trifoliolées dentées ; foliole médiane pétiolée, les latérales subsessiles. Deux stipules adnées au pétiole. Les fleurs sont petites en grappes axillaires, les gousses ont généralement une ou deux graines (Baba Abri, 2016).

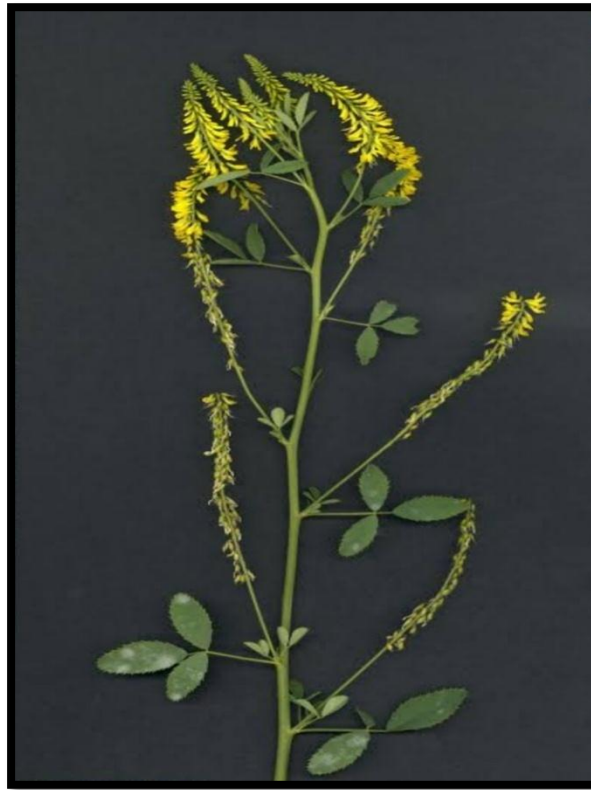


Figure 4: Plant légumineuse *Melilotus* [6].

3.2. Bactéries “*Rhizobia*”

Beijerinck (1888) a été le premier à isoler une bactérie à partir de nodules de racines de plantes, qu'il a nommée *Bacillus radicola*. À la fin du 19^e siècle, Frank, 1879, Frank, 1889 nomma cette bactérie *Rhizobium leguminosarum* et identifia d'autres espèces appartenant au même groupe. Cependant, il faudra attendre le siècle suivant pour que la diversité taxonomique des bactéries nodulaires racinaires soit reconnue. Le terme «*Rhizobium*» était à l'origine utilisé pour désigner des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*.

Les *Rhizobia* sont des bactéries du sol et de la rhizosphère capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des légumineuses et de favoriser leur croissance dans les sols pauvres en azote (Dodmergue, 2017).

3.2.1. Caractères morphologiques

Les *Rhizobiums* sont des bactéries du sol, en forme de bâtonnet à Gram négatif, mobiles et non sporulantes (Jordan, 1984). On distingue deux formes (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **La forme végétative**

Les *Rhizobia* sont des bâtonnets réguliers de 1,2 à 3 µm de longueur sur 0,5 à 0,9 µm de large, pourvus d'un flagelle polaire, ou de plusieurs flagelles péritriches. Les *Rhizobia* pourvus de 2 à 6 flagelles sont caractérisés par une croissance rapide, tandis que les *Rhizobia* à un seul flagelle polaire ou subpolaire ont une croissance lente.

- **La forme bactéroïde**

Les *Rhizobia* à l'intérieur des nodules se transforment en bactéroïdes de forme régulière ou irrégulière. Chez les groupes *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative.

3.2.2. Caractères biochimiques

Les *Rhizobiums* sont des bactéries hétérotrophes, utilisent des carbohydrates simples tels que le glucose, le saccharose, le mannitol et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.2.3. Caractères physiologiques

Les *Rhizobia* sont des bactéries aérobies ou microaérophiles et peuvent se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atmosphérique), dont la température optimale de croissance est de 28°C et le pH optimal est de 6 à 7 plus précisément 6,8, mais certaines souches tolèrent les environnements acides (pH = 4) tel que *Rhizobium japonicum* (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.2.4. Caractères cultureux

Les *Rhizobia* à croissance rapide, produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2 à 3 jours. Les bradyrhizobiums à croissance lente, produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3 à 5 jours. Les *Rhizobia* cultivés nécessitant un milieu de culture qui contient une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux (Somasegaram et Hoben, 1994). Le Yeast mannitol agar (YMA) est un milieu solide favorable pour la culture de *Rhizobium* (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

3.2.5. Classification des *Rhizobia*

La classification des *Rhizobia* a été 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.

Des études récentes ont montré l'existence d'une grande diversité parmi les bactéries fixatrices d'azote isolé à partir de différents légumes. Actuellement, plus de 98 espèces appartenant à 14 genres de α -protéobactéries et β -protéobactéries ont été décrites comme *Rhizobia*.

Des genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella* (Classe d' α -protéobactéries), *Burkholderia*, *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (classe de β -protéobactéries) et certains autres protéobactéries, forment l'ensemble des bactéries appelées les symbiotes de légumineuses.

Il y a certainement beaucoup à découvrir, puisque seulement 23% des légumineuses connues ont été identifiées spécifiquement pour la relation symbiotique à jour. La découverte de nouveaux symbiotes associés à des légumineuses est nécessaire pour avoir un aperçu en profondeur dans la taxonomie du *Rhizobium* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

Tableau 1 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

Genre espèce	Source d'isolement
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	
Ordre: <i>Rhizobiales</i>	
Famille: <i>Rhizobiaceae</i>	
Genre: <i>Rhizobium</i>	
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>Symbiovarviciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>Symbiovartrifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	
<i>Symbiovarofficinalis</i>	<i>Galegaorientalis</i>

Suite Tableau 2 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

<i>Symbiovarorientalis</i>	<i>Galegaofficinalis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Viciafaba</i>
<i>R. etliPhaseolus,</i>	
<i>Symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunianatans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovargallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Symbiovargiardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodiumsinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbaniaherbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficusbenjamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigoferaspp</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	Plusieurs espèces de légumineuses
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryzaalta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisumsativum</i>

Suite Tableau 3 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsisthaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caraganaintermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropisglabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	usine de dunes côtières
<i>R. radiobacter</i>	*
<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*
Actuellement, il y'en a 49 espèces du genre <i>Rhizobia</i> (et 11 pas du genre <i>Rhizobia</i>). <i>Rhizobium</i> en Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)	
Genre: Ensifer	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>Symbiovarfredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>Symbiovarsiensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>E. terangae</i>	les plantes hôtes différentes
<i>Symbiovaracaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>Symbiovar</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicagotruncatula, Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i>	(Formerly: <i>Glycine max Sinorhizobiumxingianense</i>)
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>

Suite Tableau 4 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

<i>E.mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>
<i>E.numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>
Genre: Shinella	
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
Le genre <i>Shinella</i> contient actuellement une seule espèce <i>Rhizobia</i> . Weir, B.S. (2016)	
Famille: Phyllobacteriaceae	
Genre: Mesorhizobium	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. cicero</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalusadsurgens</i>
<i>M. thiogangeticum</i>	*
<i>M. albiziae</i>	<i>Albziakalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caraganaspp</i>
<i>M. gobiense</i>	Wild legumes
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrulapelecinus</i>
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrulapelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllisvulneraria</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagisparsifolia.</i>
<i>M. abyssinicae</i>	Différents arbres agroforestiers de légumineuses

Suite Tableau 5 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. hawassense</i>	Différents arbres agroforestiers de légumineuses
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>M. shonense</i>	Différents arbres agroforestiers de légumineuses
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana espèce</i>
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus espèce</i>
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>
Actuellement il ya 21e espèces du genre <i>Rhizobia</i> dont une (1) non <i>Rhizobia</i> . Le genre <i>mesorhizobium</i> en Nouvelle-Zélande Weir, B.S. (2016)	
Genre: Phyllobacterium	
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Le genre <i>phyllobacterium</i> contient actuellement trois espèces de <i>Rhizobia</i> . Le/ la <i>phyllobacterium</i> en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)	
Family: Methylobacteriaceae	
Genre: Methylobacterium	
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>
Le genre <i>Methylobacterium</i> contient une seule espèces de <i>Rhizobia</i> ,Le/la <i>Methylobacterium</i> en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)	
Genre: Microvirga	
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus</i> ssp.
<i>M. lotononidis</i>	hôte légumineuse Différent
<i>M. zambiensis</i>	hôte légumineuse Différent
Le genre <i>Microvirga</i> contient actuellement trois espèces de <i>Rhizobia</i> . <i>Microvirga</i> en nouvelle zélande. Weir, B.S. (2016)	
Famille: Brucellaceae	
Genre: Ochrobactrum	
<i>Ochrobactrumcytisi</i>	<i>Cytisus</i>
<i>Ochrobactrum</i> lupini	<i>Lupinus</i> albus

Le genre *Ochrobacterium* contient actuellement deux espèces de *Rhizobia*. Le/la *Ochrobacterium* en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)

Suite Tableau 6 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

Famille: Hyphomicrobiaceae	
Genre: Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>
Le genre <i>Azorhizobium</i> se compose actuellement de 2 espèces Weir, B.S. (2016)	
Genre: Devosia	
<i>Devosianeptunia</i>	<i>Neptunianatans</i>
Le genre <i>Devosia</i> contient actuellement une seule espèce <i>Rhizobia</i> (et une 1 qui n'est pas une espèce <i>Rhizobia</i> potentiellement. Weir, B.S. (2016)	
Famille: Bradyrhizobiaceae	
Genre: Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>B. betae</i>	<i>Betaevulgaris</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae et Loteae</i>
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
Il ya actuellement 9 espèces du genre <i>Rhizobia</i> dont une (1) non <i>Rhizobia</i> . Le genre <i>Bradyrhizobium</i> en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)	

Suite Tableau 7 : Classification actuelle des *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014; Weir, B.S, 2016).

Classe: Beta Proeobacteria	
Ordre: Burkholderiales	
Famille: Burkholderiaceae	
Genre: Burkholderia	
Des espèces avec une capacité de formation de nodules non décrites sont incluses de façon traditionnelle comme la bactérie du genre <i>Rhizobia</i> .	
<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
Le genre <i>Burkholderia</i> contient actuellement sept membres nommés <i>Rhizobia</i> et d'autres <i>Burkholderia</i> sp. <i>Burkholderia</i> en Nouvelle-Zélande. Weir, B.S. (2016)	
Genre : Cupriavidus	
<i>Aspalatus</i>	<i>carnosa</i>
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i> sp.
Ce genre là contient actuellement une seule espèce <i>Rhizobia</i> . Weir, B.S. (2016)	
Class: Gamma-Proteobacteria	
Ordre: Pseudomonadales	
Famille: Pseudomonaceae	
<i>Pseuomonas</i> sp.	
<i>Robinia</i>	<i>pseudoacacia</i>
Des espèces avec une capacité de formation de nodules non décrites sont incluses de façon traditionnelle comme la bactérie du genre <i>Rhizobia</i>	

4. Nodulation

4.1. Dialogue moléculaire

L'installation de la symbiose est contrôlée par un dialogue moléculaire qui se met en place entre la bactérie et la plante-hôte. En présence de substances inductrices provenant des racines (flavonoides, bétaines), les protéines régulatrices synthétisées par les gènes *nodD* de la bactérie sont activées et induisent les gènes de structure de la nodulation. Ceux-ci comprennent à la fois des gènes dits communs (A, B et C) car, rencontrés chez toutes les espèces de *Rhizobium*, et des gènes spécifiques à une espèce de *Rhizobium*. L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens constitués de lipooligosaccharides; ce sont les facteurs de nodulation ou facteurs Nod. L'ornementation chimique du squelette de base de ces molécules est responsable en grande partie de la spécificité d'hôte, c'est-à-dire la propriété pour un symbiote de s'associer spécifiquement à un ensemble de plantes-hôtes (Duhoux et Nicole, 2004).

4.2. Nodules

L'association entre les *Rhizobia* et les Légumineuses conduit à la formation d'un véritable organe, le nodule (encore appelé nodosité), dans lequel les bactéries fixent l'azote atmosphériques (Duhoux et Nicole, 2004). La mise en place de cette association symbiotique implique une reconnaissance spécifique entre les deux partenaires. En effet, chaque espèce de *Rhizobium* possède un spectre d'hôte bien défini (François et Gaudry, 1997).

Le nodule (ou nodosité) est un organe différencié de la symbiose. Il abrite les symbiontes bactériens et leur assure les conditions nécessaires à l'activité fixatrice d'azote et favorise les échanges nutritifs entre les deux partenaires (Gobat, 2010).

Deux types de nodules : indéterminé (allongé) et déterminé (rond) définis en fonction de la localisation du système vasculaire (racine ou tige) et du niveau de persistance d'une zone méristématique (Odmergue, 2017).

Les nodules déterminés dans le développement ont été moins étudiés, se développent à partir d'un méristème central et ont donc une forme sphérique. La croissance du nodule est due à une augmentation de la taille des cellules végétales et non aux divisions cellulaires. Par conséquent, les cellules du nodule sont synchronisées, c'est-à-dire que toutes les cellules du nodule sont au même stade de développement, et entrent toutes en sénescence de façon quasi-synchrone [1].

Pour les nodules de type indéterminé, le méristème apical est persistant. Cette configuration entraîne la multiplication continue des cellules végétales à l'extrémité distale du nodule, lui donnant une forme allongée. Ainsi les cellules végétales ne vont pas être au même stade de développement au même instant, on dit que les cellules ne seront pas synchronisées. Différentes zones du nodule peuvent donc être distinguées correspondant chacune à un stade de développement différent. Le méristème apical constitue la zone I, la zone II est la zone d'infection, la zone III est la zone de fixation d'azote et la zone IV est la zone de sénescence [1].

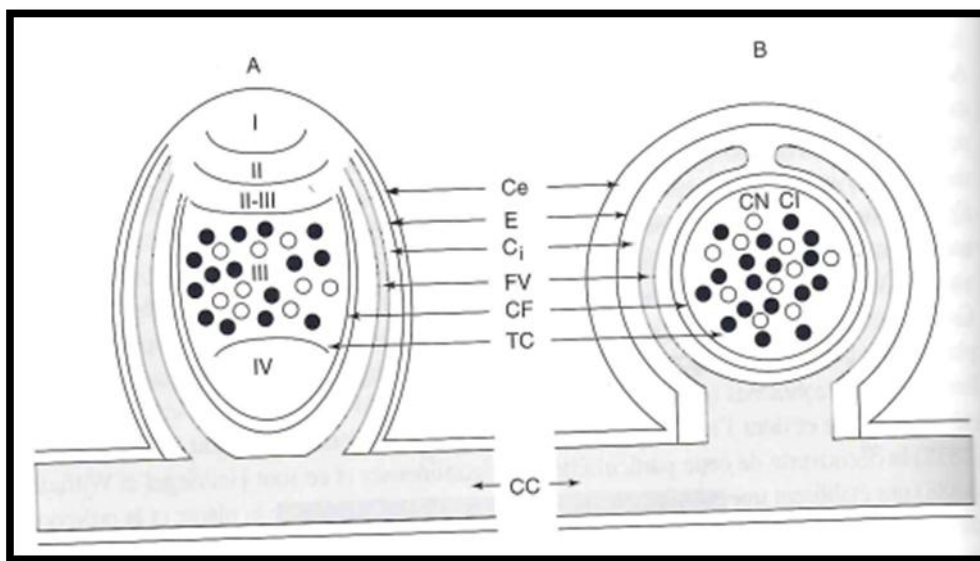


Figure 5: Coupe longitudinale schématisée d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B). I = zone méristématique, II = zone d'infection, II-III = interzone, III = zone fixatrice d'azote, IV = zone de sénescence. Ce = cortex externe, E = endoderme. Ci = cortex interne. FV = faisceau vasculaire, CF = couche frontière, TC = tissu central, CC = cylindre central de la racine, CI = cellule infectée, CN = cellule non infectée. (adapté de Franssen et *al.*, 1992).

4.3. Phases de la nodulation

La nodulation est un processus biologique qui implique la formation de petites protubérances, appelées nodules, sur les racines des plantes, principalement des légumineuses [7]. La formation des nodules fixateurs d'azote se fait en plusieurs étapes.

Comme pour la plupart des symbioses, la première étape consiste en une reconnaissance mutuelle effectuée par l'échange de messages chimiques entre les deux partenaires. C'est une étape très spécifique.

La reconnaissance se fait en deux phases :

- **Phase d'attraction** : quand la légumineuse est en manque d'azote, ses racines émettent des flavonoïdes, composés hétérocycliques (quercétine, lutéoline, rhamnétine...) qui attirent les rhizobactéries à proximité des jeunes poils absorbants des racines.
- **Phase de reconnaissance**: en réponse à ces flavonoïdes, les rhizobactéries synthétisent des facteurs Nod, ou produits des gènes Nod (oligomères de glucosamine), qui, pour chaque espèce bactérienne, diffèrent par au moins un groupement (hydrogène, acyle, méthyle ou sulfate), ce qui explique en partie la spécificité des interactions. Les cellules des racines possèdent des récepteurs spécifiques des facteurs Nod au niveau de leurs membranes plasmiques. La réception des facteurs Nod induit une chaîne de signalisation cellulaire. Cette chaîne aboutit à la synthèse des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes, dont les produits induisent les modifications biochimiques et structurales des symbiontes, permettant la formation et le fonctionnement des nodules fixateurs d'azote.

Après la reconnaissance des partenaires, la formation et l'organisation des nodules fixateurs de l'azote s'effectue lors des phases suivantes :

- **Phase d'infection** : pendant laquelle les rhizobactéries pénètrent dans les cellules du poil absorbant en formant un cordon infectieux discontinu, qui a pour effet recourber le poil absorbant. Ce cordon se ramifie pour entrer dans les cellules corticales de la racine. Cette phase comprend aussi l'activation de mitoses par des nodulines codées par des gènes que la réception des facteurs Nod a précocement activés. Ces mitoses aboutissent à la formation de petits méristèmes (tissus indifférenciés) qui permettront l'organogenèse des futures nodosités, en contact avec les tissus conducteurs de la racine. À ce stade, les bactéries ayant infecté les cellules de la racine se transforment en gros bactéroïdes qui absorbent les sucres issus de la photosynthèse de la plante hôte.
- **Phases d'activation de la division cellulaire** : permettent de former des petits méristèmes qui vont fusionner pour initier l'organogenèse de la nodosité. À ce stade, les nodosités ne sont pas encore fonctionnelles pour la fixation de l'azote gazeux.
- **Phase de différenciation de la nodosité** : avec organisation en quatre zones, une zone méristématique (division), une zone de croissance et d'infection avec les cellules

contenant les bactéroïdes, une zone de fixation d'azote et une zone de sénescence (Suty, 2015).

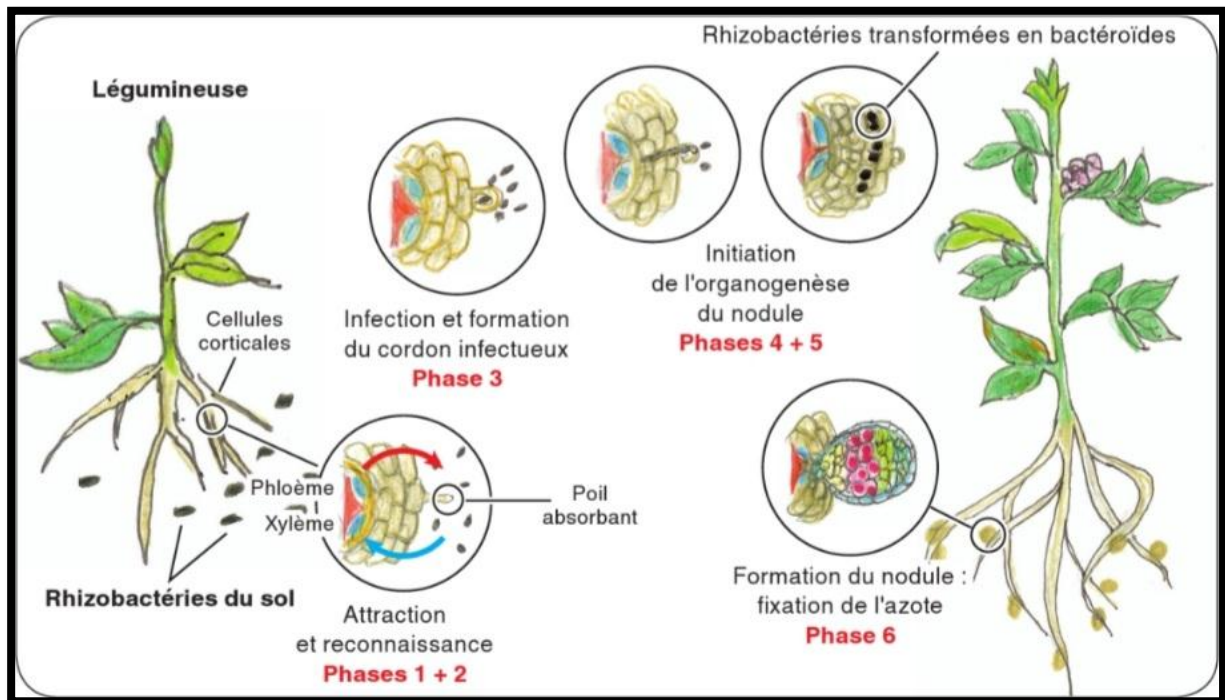


Figure 6: Formation des nodules fixateurs d'azote (Suty, 2015).

5. Importance de l'identification biochimique des bactéries

Les Bactéries sont des organismes minuscules que l'on trouve à peu près partout (Paul Singleton, 2005). Elles sont identifiées dans les laboratoires par diverses méthodes, notamment la microscopie (état frais, après coloration), l'observation des caractéristiques de croissance (liste des milieux de culture), la détermination des réactions aux composés organiques et inorganiques (galerie API, techniques microbiologique) [8].

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimiques, par différents tests qui permettent l'identification de caractères morphologiques et métaboliques, parmi lesquels : la forme, la structure des parois, la présence des flagelles, les voies d'utilisation du glucose (fermentative ou oxydative), les systèmes enzymatique caractéristiques (oxydase, catalase...) [9].

Parmi ces tests rapides pour l'identification biochimique des bactéries on utilise les galeries : les galeries classiques et les galeries de tests biochimiques miniaturisés.

Les galeries (galerie API20NE, galerie API20E) se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique.

Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment [10].

Les techniques classiques nécessitaient une à trois semaines, les gammes miniaturisées permettent l'obtention des résultats sous 18 à 72 heures [11]. Ils sont choisis par les biologistes pour leur rapidité et facilité d'utilisation et par leur haute performance. Se sont une référence dans les laboratoires de microbiologie avec des résultats fiables, simple à utiliser et à mettre en œuvre au laboratoire avec des performances mondialement reconnues [12].

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1. Description de la zone d'étude

Les deux plantes "*Melilotus*" et "*Scorpiurus*" utilisés dans cette étude ont été prélevées de la région de Guelma.

Guelma se situe au cœur d'une grande région agricole à 290 m d'altitude, entourée de montagnes (Maouna, Dbegh, Houara) ce qui lui donne le nom de ville assiette, sa région bénéficie d'une grande fertilité grâce notamment à la Seybouse et d'un grand barrage qui assure un vaste périmètre d'irrigation. Elle est située à 60 km au Sud-Ouest d'Annaba, à 110 km à l'Est de Constantine, à 60 km de la mer Méditerranée et à 150 km de la frontière tunisienne [13]. La région septentrionale de la wilaya est dominée par un climat subhumide, alors que sa partie méridionale est caractérisée par un climat semi-aride (Debieche, 2002) (Sité in Haddad et *al.*, 2015). Les températures moyennes varient entre 4°C en hiver et 41°C en été. Les précipitations annuelles varient entre 654 et 1000mm (Haddad et *al.*, 2015). Les coordonnées géographiques de la wilaya de Guelma sont 36° 28' 0" Nord, 7° 25' 60" Est avec une Latitude de 36.4667 et une Longitude de 7.4333 [14].



Figure 7: Localisation géographique de la zone de prélèvement (Charchar et *al.*, 2020)

2. Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant les mois

de Mars et Avril quand la terre est sèche, à cette période de l'année les nodules sont bien développés et sont visibles au niveau des racines, ils sont d'une couleur rougeâtre, et peuvent indiquer la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée selon la méthode de (Vincent, 1970) et (Somasegaran et Hoben, 1994).

Cette méthode consiste à :

- Creuser à 15 cm autour de la plante et à une profondeur de 20 cm, ceci afin de prélever la plante entière avec tout son appareil racinaire sans l'endommager.
- Extraire délicatement le bloc de sol et enlever manuellement la terre liée aux racines en faisant attention à ne pas tirer dessus (surtout les racines secondaires qui portent souvent beaucoup de nodules).



(a)



(b)

Figure 8: (a) Plante légumineuse *Scorpiurus*.

(b) Plante légumineuse *Melilotus*

- Placer la plante, les racines en bas, dans un sac en plastique pour transporter au niveau du laboratoire.
- Rincer délicatement les racines sous un courant d'eau des restes de terre puis sécher au papier filtre.



Figure 9: (a) Racines de la plante *Scorpiurus* avec nodules.

(b) Racines de la plante *Melilotus* avec nodules.



Figure 10: Nodules prêts à être utilisés ou conservés.

3. Conservation des nodules

La conservation se fait dans un tube en verre contenant du CaCl_2 couvert de coton, les nodules sont déposés sur le coton et le tube est fermé hermétiquement et identifié d'une étiquette portant les informations suivantes

- Nom de la plante hôte.
- Date de conservation.
- Date et lieu de Collecte (Bakkouche et Bendar, 2017).

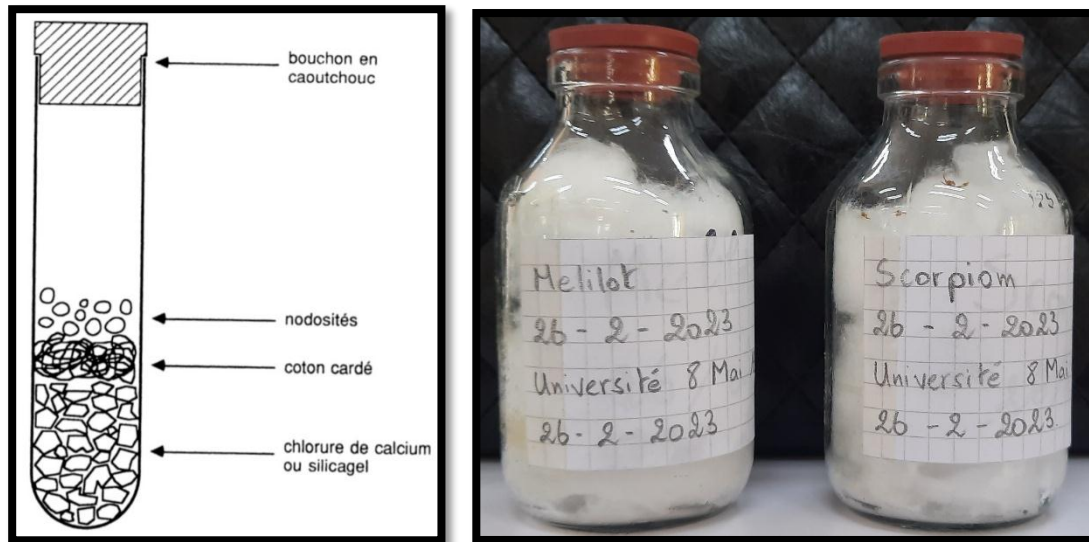


Figure 11: Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

4. Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement se fait à partir des nodules frais ou des nodules conservés.

Les nodules frais sont utilisés directement, ceux conservés au réfrigérateur sont laissés à température ambiante pendant 1h avant utilisation, et ceux conservés au CaCl_2 sont réhydratés toute une nuit dans l'eau de robinet à 4°C puis laissés pendant 1h à température ambiante. (Vincent, 1970).

L'isolement se fait selon les étapes suivantes :

4.1. Stérilisation des nodules

La surface externe des nodules doit être bien stérile car le but est d'isoler les bactéries présentes à l'intérieur de ces nodosités.

En présence des conditions d'asepsies, les nodules frais sont mis dans des tubes stériles et émergé par l'éthanol 95% pendant 10 secondes, puis par une solution de chlorure de mercure acidifié HgCl_2 0,1% (Annexe) pendant 3 minutes. En suite les nodules sont rincés 10 fois par l'eau distillée stérile, et sont laissés gonfler pendant 1heure après le dernier rinçage.

4.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

A proximité du bec Bunsen, à l'aide d'une pince stérile par l'éthanol et le flamage les nodules sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de pétri stérile, jusqu'à obtenir un jus nodulaire de couleur blanchâtre.

Avec une anse de platine flambé est refroidie, le jus nodulaire est étalé sur la surface du milieu Yeast-Mannitol-Agar additionné de rouge Congo (YMA-RC) (Annexe), et aussi sur la surface du milieu Glucose peptone agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA-BCP) (Annexe). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970). L'ensemble des boîtes sont incubées à 30 °C de 24h à 72h.

5. Caractères culturels

Pour faire l'identification, plusieurs milieux de culture sont utilisés.

Les milieux solides

YMA (Yeast Mannitol Agar),

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

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

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

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48h.

Le milieu liquide

YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe).

Les tubes qui contiennent 9 ml du milieu sont incubés à 30°C pendant 24 à 48h.

6. Examen microscopique

Une coloration de Gram est réalisée pour mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et distinguer les bactéries dites Gram +, des bactéries dites Gram -.

Après préparation du frottis, les étapes de coloration sont les suivantes :

- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane, laisser agir une minute.
- Verser le lugol et laisser agir 30 secondes.
- Ajouter goutte à goutte l'alcool.
- Rincer avec de l'eau distillée.
- Recolorer la lame avec de la fuschine, laisser une minute.

- Rincer avec de l'eau distillée et sécher la lame avec du papier absorbant.
- Observer à immersion.

7. Effet des facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques ont tendance à influencer le cycle biologique des individus d'une population. Un même facteur peut faciliter la reproduction et la survie des individus d'une espèce, alors qu'il peut nuire à la reproduction et à la survie d'une autre espèce [15].

Les facteurs abiotiques sont la structure sur laquelle sont construits les écosystèmes.

7.1. Température de croissance

Pour évaluer les températures optimales et maximales de croissance des souches, ces dernières sont ensemencées sur la surface du milieu YMA à différentes valeurs de températures : 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 44°C.

La lecture des boîtes est effectuée après 24 à 48h. Pour les boîtes à 4°C on peut aller jusqu'à dix jours.

7.2. Croissance à différentes valeurs du pH

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu YMB où les souches sont ensemencées à différentes valeurs du pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9, et 10. Tous les tubes sont incubés à 30°C avec agitation pendant 24h. La croissance bactérienne est évaluée par la mesure de la densité optique à 620 nm.

7.3. Tolérance au NaCl

Toutes les souches sont ensemencées sur le milieu YMB à différentes concentrations: 0.1%, 1%, 2%, 3%, 5%, et 10 %. Incuber avec agitation à 30°C pendant 24h.

8. Test de Mannitol-mobilité

Ce test permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement des souches est réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond de la gélose (Annexe) à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu du rouge au jaune. Les bactéries mobiles se déplacent à partir de la ligne

d'ensemencement en créant un trouble dans le milieu, alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (Gerhardt et *al.*, 1994).

9. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Produit toxique pour les bactéries) en eau et oxygène. Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le résultat positif se traduit par formation de bulles d'air [16].

10. Test de l'oxydase

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide et la déposer doucement sur le disque

Après 30 secondes on observe l'apparition d'une tache rose violette qui indique que la bactérie possède l'activité oxydase (oxydase +) [17].

11. Caractérisation biochimique des isolats par les galeries API

L'identification biochimique des bactéries est réalisée en utilisant les galeries biochimiques. Les galeries API ou également appelées galeries de tests biochimiques miniaturisés se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment.

Dans cette étude nous avons utilisé les galeries API 20 E et API 20 NE.



Figure 12 : Illustration de galerie biochimique API 20 E. [18]

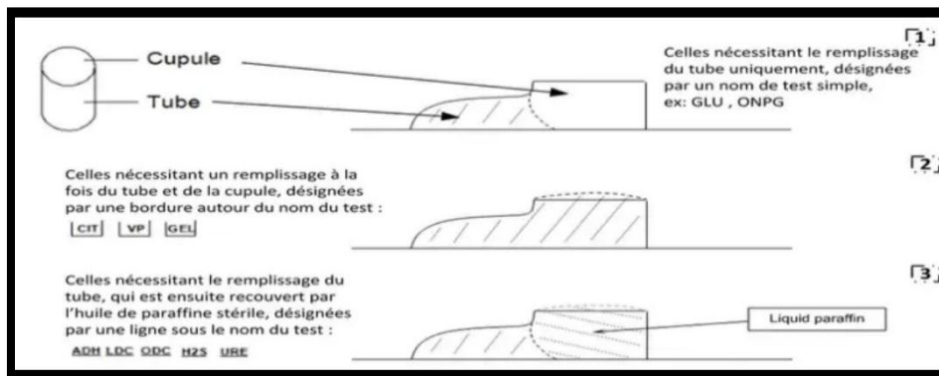


Figure 13: Illustration d'un tubule. [19]

11.1. Galerie API 20 E

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Annexe).



Figure 14: Galeries API 20 E après ensemencement.

11.2. Galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Annexe).



Figure 15: Galeries API 20 NE après ensemencement.

11.3. Préparation de la suspension bactérienne 0.5 McFarland

Les normes McFarland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens [20].

La suspension bactérienne 0.5 McFarland se prépare en ajustant la densité optique d'une suspension bactérienne à une valeur de 0.08 et 0.10 à une longueur d'onde de 625nm.

Mettre une colonie de souche pure dans 5ml du milieu YMB et incuber à 30°C pendant 18-24 heures. Après 18h d'incubation, ajuster la turbidité de la suspension bactérienne par l'utilisation de spectrophotomètre.

12. Analyse statistique

Pour déterminer le statut taxonomique de nos isolats on a essayé de faire une analyse numérique en utilisant le logiciel XLstat à partir des résultats des galeries biochimiques

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

1. Etude morphologique des bactéries isolées à partir des nodules des plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Melilotus*

Dans cette étude nous avons tenu compte de six isolats à partir des nodules des racines des plantes légumineuses prélevés de la wilaya de Guelma. Nous avons obtenu les souches M1, M2 et M3 à partir des nodosités de la plante *Melilotus*, et les souches S1, S2 et S3 à partir des nodosités de plantes *Scorpiurus*.

1.1. Caractères cultureux

1.1.1. Croissance sur milieu YMA

Les résultats obtenus de la caractérisation culturelle des isolats sur milieu YMA montrent des colonies de couleur blanche de forme arrondie, convexe, crémeuses, de taille variée de 1 mm à 5mm. Ce qui est décrit par Somasegaran et Hoben en 1985.

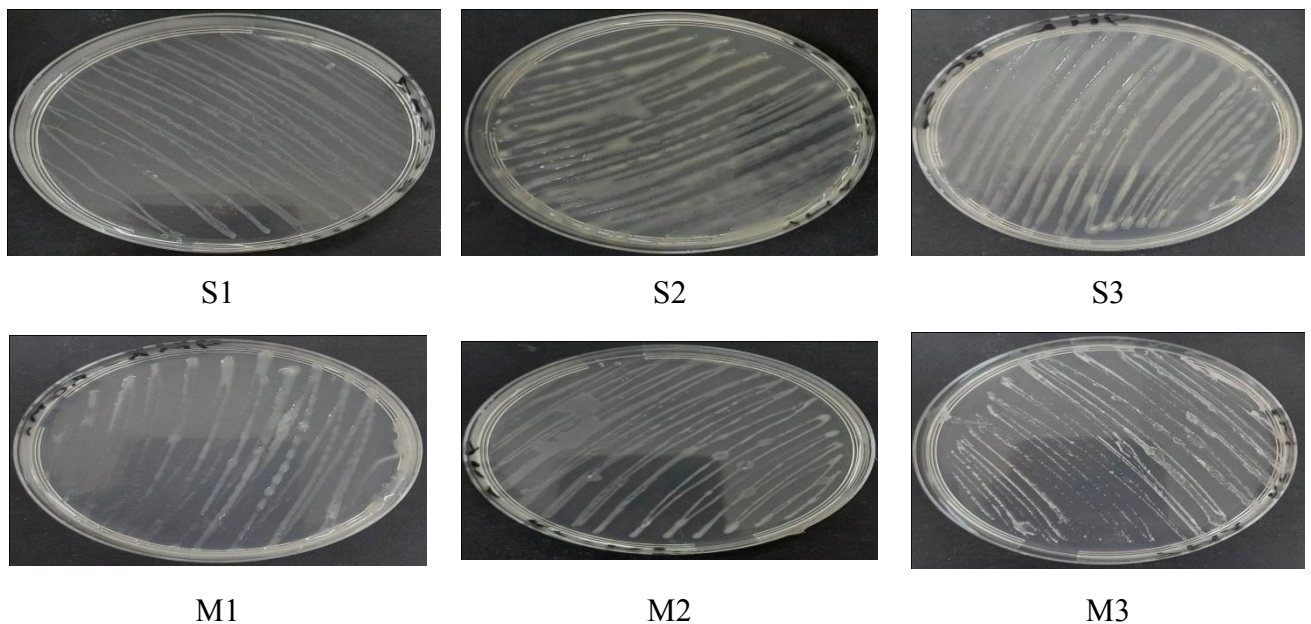


Figure 16 : Croissance des souches isolées sur milieu YMA.

1.1.2. Croissance sur milieu YMA-RC

La croissance sur milieu YMA additionné de Rouge Congo apparaisse après 24 à 48 heures d'incubation. Nos résultats montrent que toutes les colonies absorbent très peu de rouge Congo et apparaissent avec une couleur légèrement rose, sauf la souche M1 qui a bien absorbé le rouge Congo.

Somasegaran et Hoben en 1985 démontrent que les colonies doivent montrer peu ou pas d'absorption du rouge Congo lorsqu'elles sont incubées dans l'obscurité. Cependant certaines souches présentent des exceptions tels que des souches de *R. meliloti* qui absorbent fortement le rouge Congo.

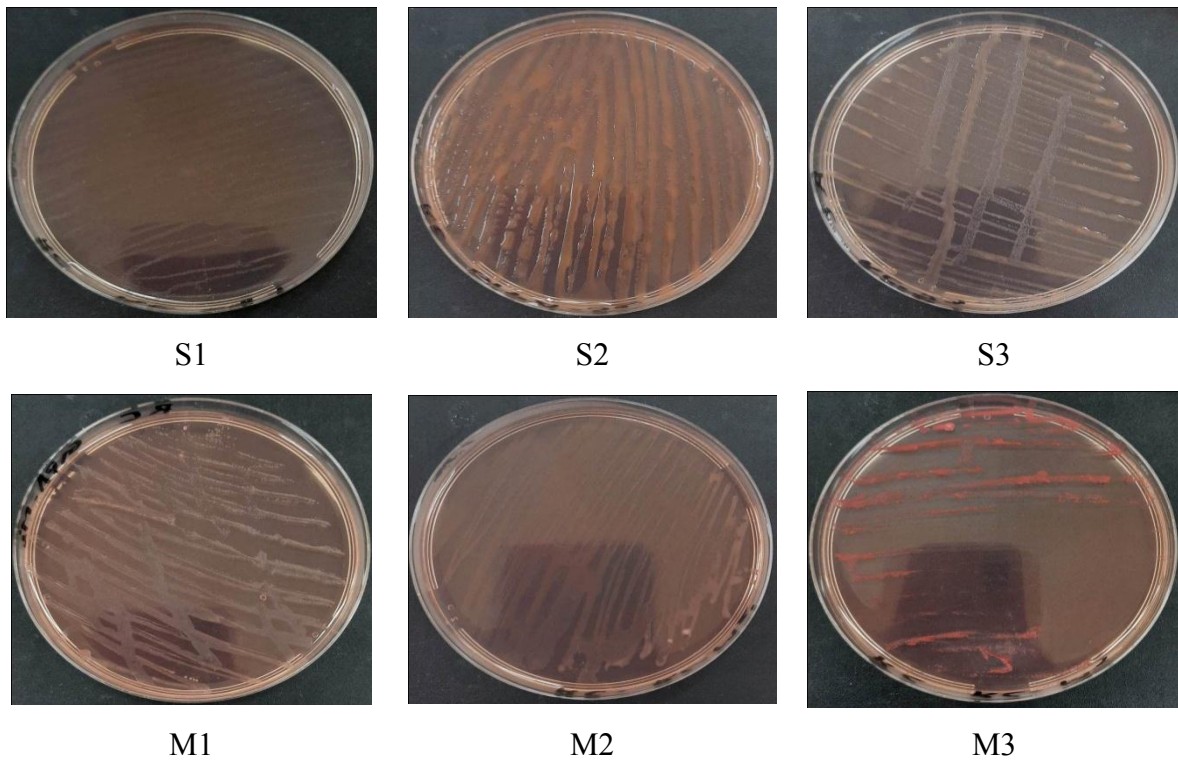
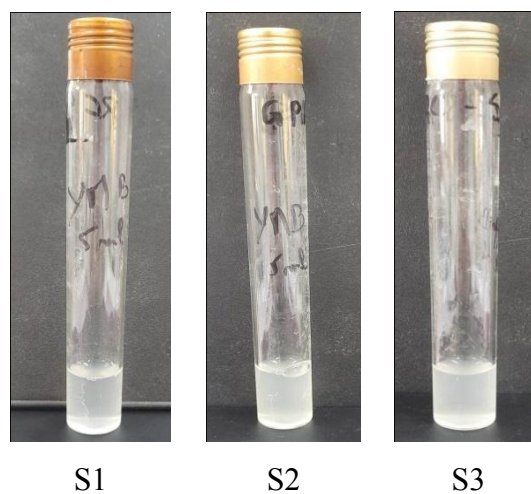


Figure 17: Croissance des souches isolées sur milieu YMA-RC.

1.1.3. Croissance sur milieu YMB

La croissance sur le milieu YMB après 24 à 48 heures, se traduit par l'apparition d'un trouble pour toutes les souches.



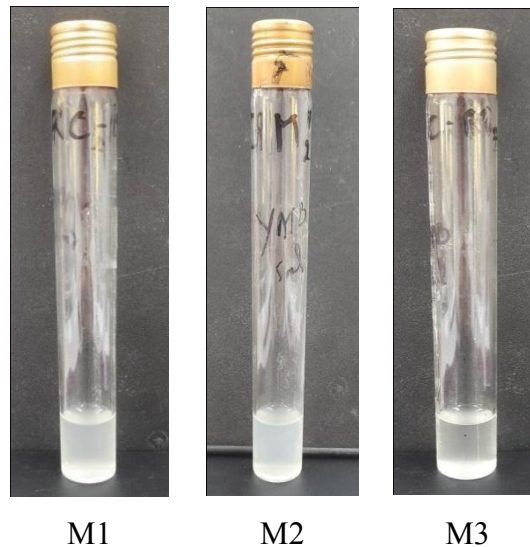
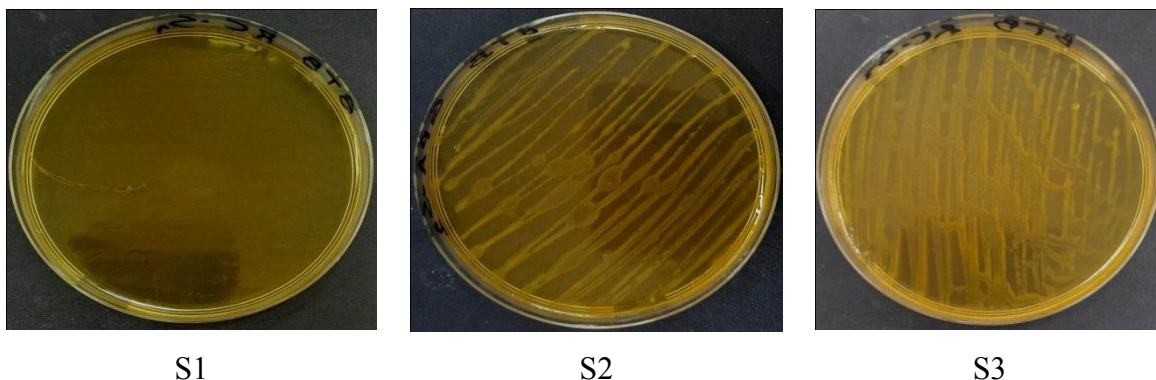


Figure 18 : Croissance des souches isolées sur milieu YMB.

1.1.4. Croissance sur milieu YMA+BTB

Les souches incubées pendant 24 à 48 heures acidifient le milieu et provoquent un virage de la couleur de milieu YMA-BTB de vert vers le jaune, par contre le milieu reste vert avec les souches M1 et M3 ce qui indique que les souches M1 et M3 ont une croissance lente.

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 virant 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 ; Pagano, 2008).



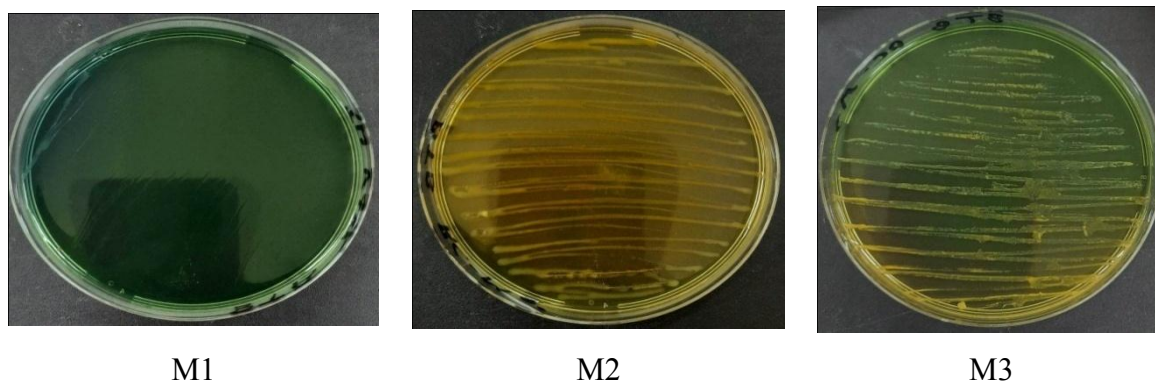


Figure 19 : Croissance des souches isolées sur milieu YMA+BTB.

1.1.5. Croissance sur milieu GPA +BCP

Pour le milieu GPA contenant le pourpre de bromocrésol, les souches S1, S2 et S3 provoquent une modification du pH et change la couleur du milieu du violet vers le jaune comme les résultats de certaines souches isolées par Nguyen et *al.*, 2022. Pour les souches M2 et M3 modifient très peu le milieu GPA-BCP et la souche M1 ne modifie pas le pH du milieu comme les résultats montrés par Torche et *al.*, 2010.

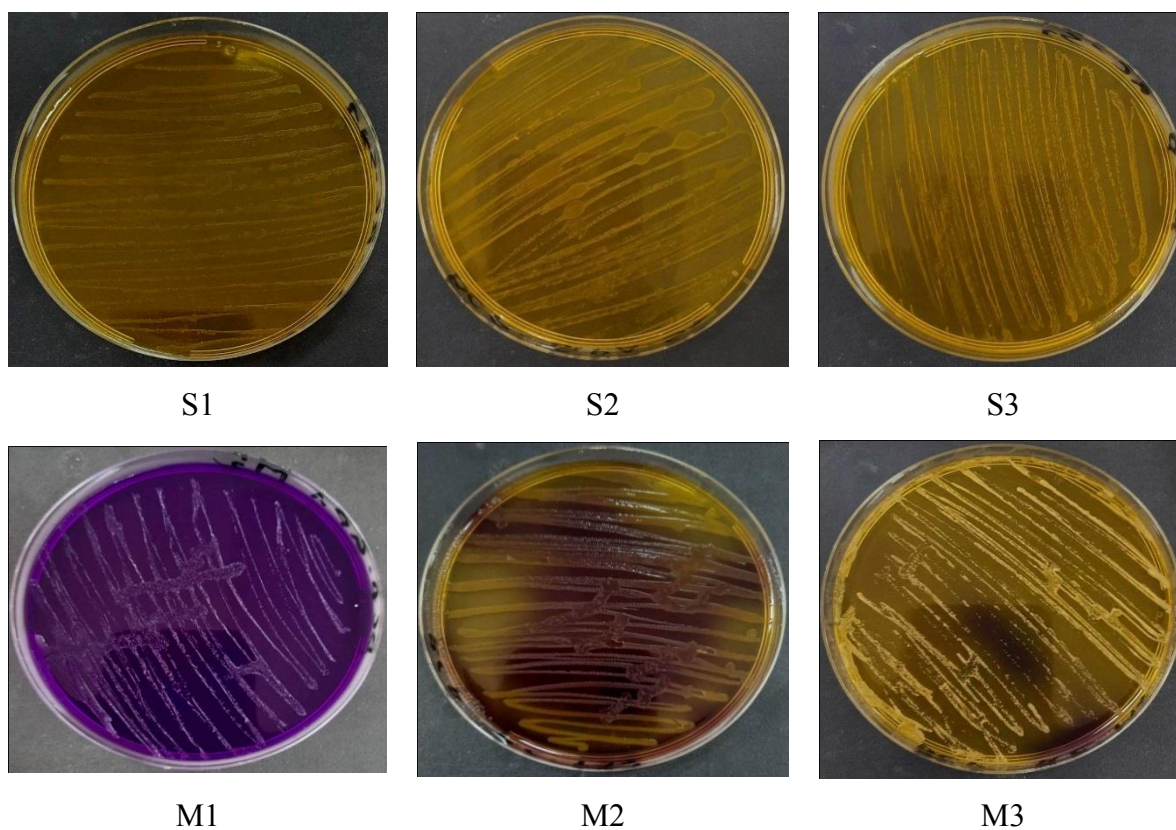


Figure 20 : Croissance des souches isolées sur milieu GPA+BCP.

1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram

L'observation microscopique montre des petites cellules de forme bâtonnet à Gram négatif (figure 21). Ces caractères morphologiques observés sont en accord avec ceux décrits pour des *Rhizobia* (Vincent, 1970 ; Dommergues et Mangenot, 1970 ; Jordan, 1984 ; Rome et al., 1996 ; Mazouz, 2018).



Figure 21 : Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100).

Tableau 8 : Caractères morphologiques des six isolats.

Souches	Caractères des cellules		Caractères des colonies					
	Gram	Forme	Taille	Couleur	Elevation	Borde	Consistance	Opacité
S1	Négatif (-)	Bâtonnet	1 mm	Blanche	Convexe	Régulier	Crémeuse	Translucide
S2	Négatif (-)	Bâtonnet	1-2 mm	Blanche	Convexe	Régulier	Crémeuse	Translucide
S3	Négatif (-)	Bâtonnet	2 mm	Blanche	Convexe	Régulier	Crémeuse	Translucide
M1	Négatif (-)	Bâtonnet	3-5 mm	Blanche	Convexe	Régulier	Crémeuse	Translucide
M2	Négatif (-)	Bâtonnet	3 mm	Blanche	Convexe	Régulier	Crémeuse	Opaque
M3	Négatif (-)	Bâtonnet	1-5 mm	Blanche	Convexe	Régulier	Crémeuse	Opaque

2. Effet des facteurs abiotiques

2.1. Température de croissance

Après incubation des souches sur milieu YMA à différentes températures l'intervalle de croissance observé chez les souches testées est de 20°C jusqu'à 37°C, avec un optimum de croissance à 30°C. Ces résultats ressemblent à celles observés par (Maâtallah et al, 2001).

La souche M3 est la seule souche qui présente une bonne croissance à toutes les températures. Les souches M2 et S2 ne tolèrent pas les températures élevées. S2 et S3 sont les seules souches qui peuvent pousser après 3 jours d'incubation à 4°C.

Tableau 9 : Croissance à différentes valeurs de température.

Souches \ T°	4 c°	20 c°	25 c°	30 c°	37 c°	44 c°
S1	-	++	+	+++	++	++
S2	-	+++	+++	+++	++	-
S3	-	+++	+++	+++	++	++
M1	-	+	+	+++	+	+
M2	+ (3j)	+++	++	+++	+	-
M3	+ (3j)	+++	++	+++	+	+

2.2. Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance démontrent que les souches sont capables de pousser dans une gamme de PH allant de 5 à 8. Aussi que la tolérance des *Rhizobia* à un pH acide dépend de leur capacité de maintenir un pH intracellulaire entre 7.2 et 7.5, même à un pH acide externe. Les souches S2 et S3 présentent une croissance élevée à pH=10. Jordan (1984) a montré que les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer des pH allant de 4.5 à 9. (Ruiz-Diez et al., 2009 ; Mahdhi et al., 2008) (sité dans Hannane et al., 2016) ont montré que toutes les souches ont poussé dans du milieu YMB avec des valeurs de pH de 5,0 à 9,0, avec une croissance optimale à pH 7 et 7,5.

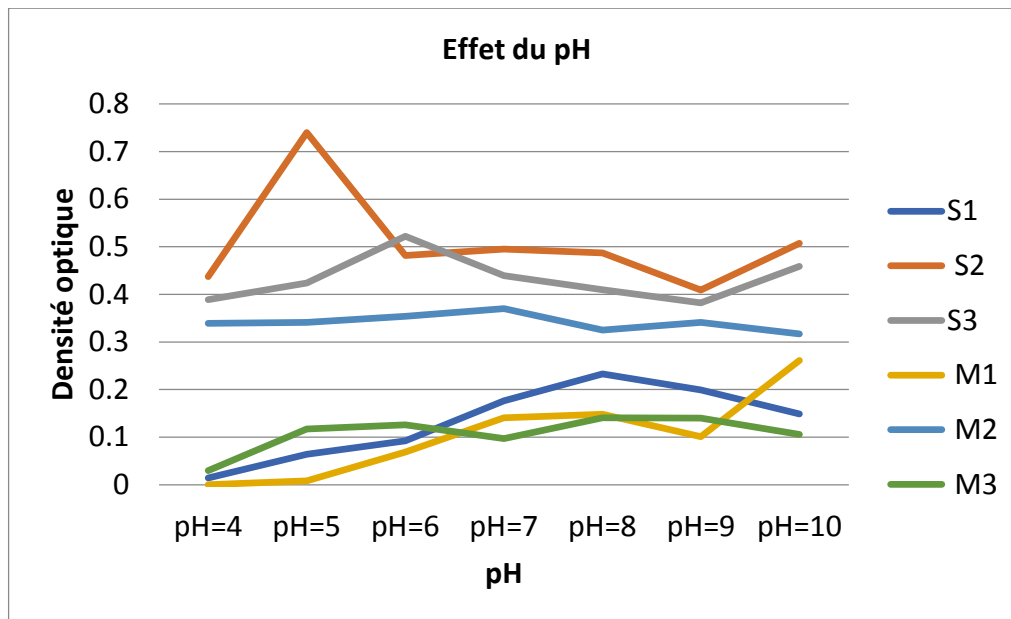


Figure 22 : croissance à différentes valeurs du pH.

2.3. Tolérance au NaCl

Les souches isolées montrent une sensibilité variée aux différentes concentrations de NaCl. Toutes les souches peuvent croître dans un milieu salin allant jusqu'à 3% de NaCl, sauf la souche M1 montre un déclin à une concentration de 1%. Le déclin de croissance était décrit entre 5% et 10% pour toutes les souches qui ne tolèrent pas les fortes concentrations de NaCl.

La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah et al., 2001).

Certaines souches de *Rhizobium* ont la capacité de croître à des concentrations élevées (4 - 5%) en sel bien que, (Bhattacharya et al. 2013) ont rapporté que les *Rhizobium* sp. isolées de *Pisum sativum* sont capables de se développer en présence de 1% en NaCl, mais incapables de se développer à des concentrations supérieures. Les souches de *Rhizobium* à croissance rapide, productrices d'acides sont généralement plus tolérantes aux sels que les souches à croissance lente et alcalinisantes (Abdelmoumen et al., 1999). La tolérance au sel varie selon le génotype du symbiote. Certaines hypothèses évoquent que certaines souches de *Rhizobium* pouvaient accroître la tolérance de la plante hôte à la salinité (Dommergues et al., 1998).

La capacité bactérienne de s'adapter à la salinité est importante pour la fonction de fixation d'azote bactéroïde à l'intérieur des nodules des légumineuses. En outre, l'activité du

nitrogénase, le nombre de nodule et l'accumulation de matière sèche dans le soja et la luzerne ont été affectées par le stress salin (Boukhellout, 2009 ; Zahran, 1999).

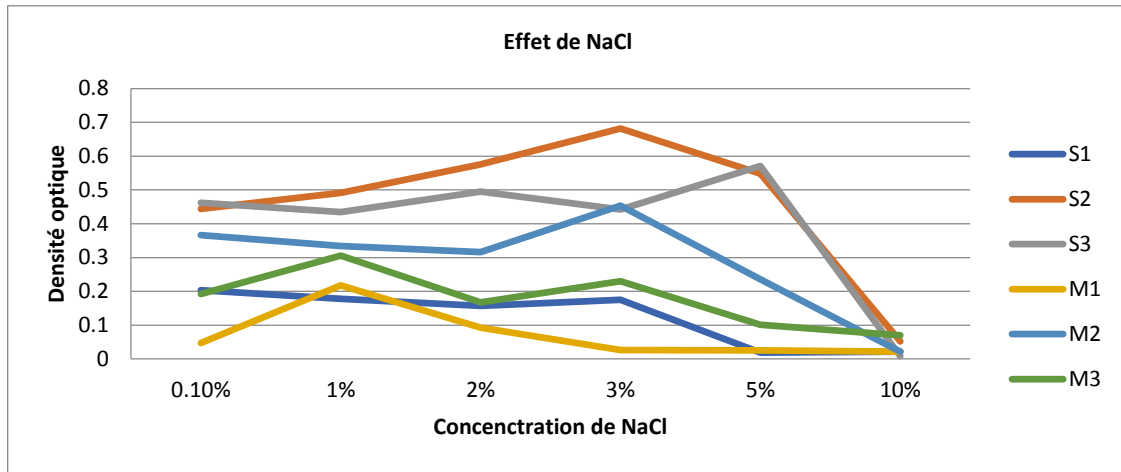


Figure 23 : croissance à différentes concentrations de NaCl.

3. Test de Mannitol mobilité

Après 48 heures d'incubation, on a observé un envahissement de gélose au niveau de la pique centrale chez les souches S1, S3 et M3 qui signifie que les bactéries sont mobiles. Les souches S2 et M2 ont montré envahissement faible. La fermentation du Mannitol est bien observée chez les souches S1, S2, S3 et M2. La souche M3 a montré un faible degré de virage de couleur du milieu. La souche M1 est la seule qui ne montre ni le virage de couleur de milieu de rouge vers le jaune, ni la mobilité des cellules.

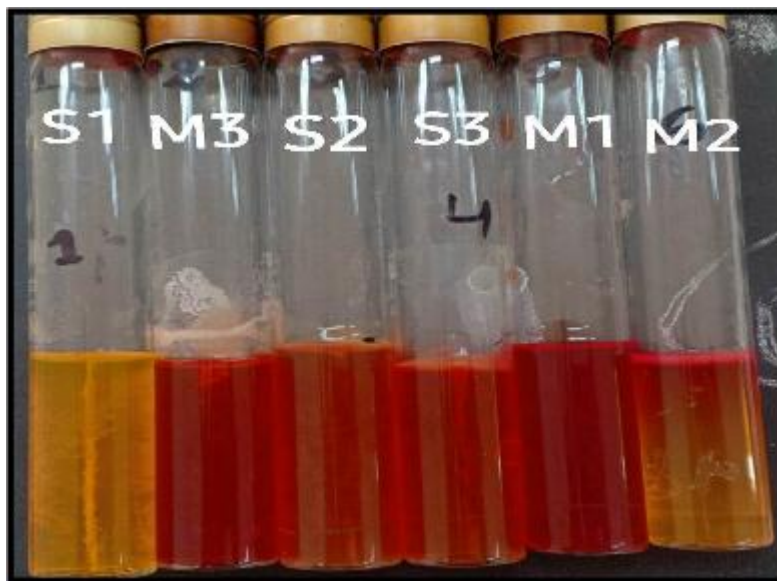


Figure 24 : Test Mannitol-Mobilité après 24h.

Tableau 10 : test de Mannitol-Mobilité.

Souches Tests	Durée d'incubation	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Mobilité	24 h	-	-	-	-	-	-
	48 h	++	+	++	-	+	++
Fermentation	24 h	++	+	+	-	+	-
	48 h	+++	++	++	-	++	+

+ : faible mobilité avec un virage de couleur ; ++ : mobilité avec un virage de couleur ; +++ : bonne mobilité avec un bon virage de couleur ; - : absence de mobilité et absence de virage de couleur.

4. Test de la catalase

Les souches M1, M2, M3, S2 et S3 catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) donc ils sont catalase positive. Par contre la souche S1 est testé catalase négative. (Figure 25).

5. Test de l'oxydase

Pour le test oxydase, les deux souches M1 et M2 produits l'enzyme cytochrome oxydase qui est absent dans les souches S1, S2, S3 et M3.

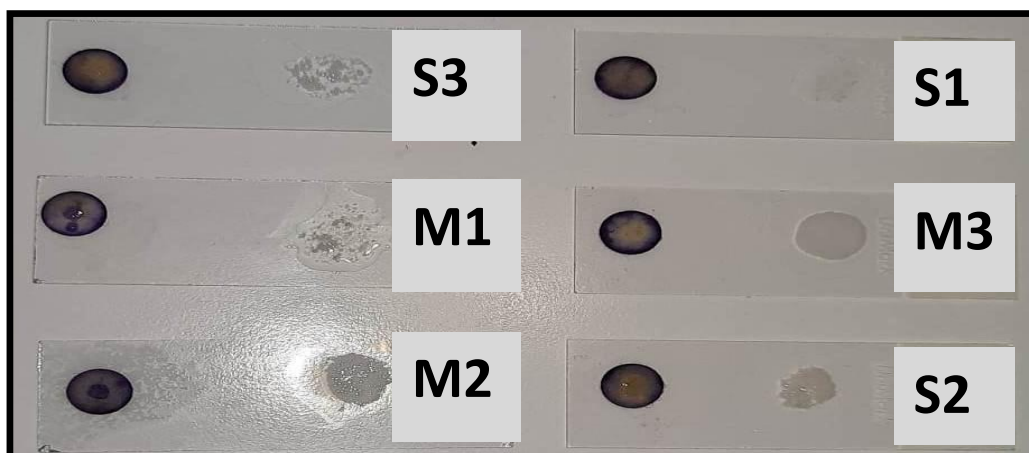


Figure 25 : Tests catalase et oxydase.

Tableau 11: Les résultats des tests catalase et oxydase.

Souche \ Test	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Catalase	-	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	+	+	-

+ positive, - négative

6. Identification biochimiques

6.1. Galeries API 20 E

Les résultats de lecture de la galerie API 20 E après l'incubation pendant 24 heures à 30°C (Annexe) nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des quatre souches S2, S3, M1 et M2. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Résultats de la galerie API 20E des souches.

Tests	Isolats			
	S2	S3	M1	M2
ONPG	+	+	-	+
ADH	+	+	+	+
LDC	-	-	+	+
ODC	+	-	-	-
CIT	+	+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	+	+	+	+
IND	-	-	-	-
VP	-	-	-	-
GEL	-	-	+	+
GLU	+	+	-	+
MAN	+	+	+	+
INO	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+
SAC	+	+	-	+
MEL	+	+	+	+
AMY	+	+	-	+
ARA	+	+	-	+

+ positive, - négative



Figure 26 : Résultats des galeries API 20 E.

6.2. Galerie API 20 NE

Les résultats sont résumés dans le tableau suivants (Annexe)

Tableau 13 : Résultats des galeries API 20NE des souches.

Tests	isolats			
	S2	S3	M1	M2
NO3	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-
GLU	+	+	+	-
ADH	-	+	+	+
URE	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+
GEL	-	+	+	+
PNG	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+
GNT	+	+	+	+
CAP	+	-	-	-
ADI	+	+	+	+
MLT	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+
PAC	-	-	+	+

+ positive, - négative



Figure 27: Résultats des galeries API 20 NE.

7. Analyse statistique

Pour déterminer le statut taxonomique de nos isolats on a essayé de faire une analyse numérique en utilisant le logiciel XLstat. Cette analyse est réalisée en deux étapes, la première consiste à déterminer le degré de similitude avec des souches identifiées et répertoriées (tableau 8). La deuxième analyse permet de voir le rapprochement taxonomique de nos isolats avec les souches de référence.

Tableau 14 : Souches utilisées dans l'étude statistique

Souches	Code	sources
<i>Rhizobium trifolii</i>	RtS1	Niste et al., 2015
<i>Sinorhizobium melliloti</i>	SmM1	Niste et al., 2015
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	R1	Abd El-Ghany et al., 2020
<i>Bradyrhizobium jaboricum</i>	R20	Abd El-Ghany et al., 2020
Isolat de <i>Scorpiurus</i>	S2	Notre étude
Isolat de <i>Scorpiurus</i>	S3	Notre étude
Isolat de <i>Mellilotus</i>	M1	Notre étude
Isolat de <i>Mellilotus</i>	M2	Notre étude

A partir de l'étude biochimique par les galeries miniaturisées API 20E et API 20 NE les résultats obtenus démontrent que la souche S2 présente un degré de similitude élevé avec les souches Rt S1 et SmM1. Le même résultat est observé avec la souche S3. Pour les souches M1 et M2 on a observé un degré de similitude élevé avec la souche R20. Tableaux (8,9 et 10)

Tableau 15 : Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence
galeries API 20E

Isolat Souche référence	S2	S3	M1	M2
RtS1	15	16	12	14
SmM1	15	14	12	14
R1	8	9	9	7
R20	10	11	11	13

Tableau 16 : Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence
galeries API 20 NE

Isolat Souche référence	S2	S3	M1	M2
RtS1	13	12	13	12
SmM1	14	13	12	11
R1	11	12	11	12
R20	12	15	16	15

Tableau 17: Degré de ressemblance entre les isolats et les souches de référence
galeries API 20E + API 20 NE

Isolat Souche référence	S2	S3	M1	M2
RtS1	28 (70%)	28 (70%)	25 (62,5)	26 (65%)
SmM1	29 (72%)	27 (67%)	24 (60%)	25 (62,5)
R1	19 (47,5%)	21 (52,5%)	20 (50%)	19 (47,5%)
R20	22 (55%)	26 (65%)	27 (67%)	28 (70%)

Le dendrogramme obtenu démontre la présence de trois groupes de souches. On observe aussi que nos isolats se rapprochent principalement aux souches RtS1 et SmM1.

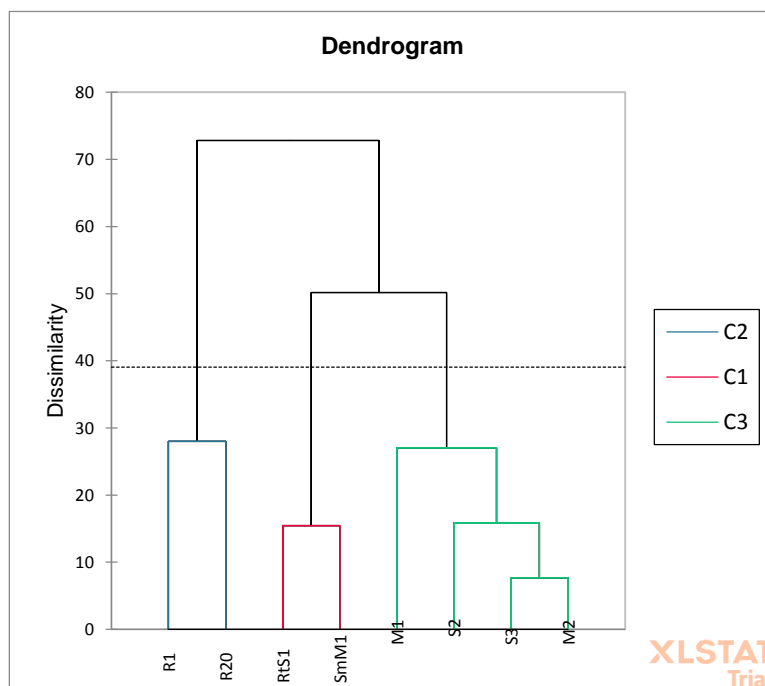


Figure 28 : dendrogramme démontrant le rapprochement taxonomique des isolats

Conclusion

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'étudier des souches bactériennes isolées à partir des nodules des plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Melilotus* situés dans la région de Guelma.

L'étude des isolats est commencée par une étude morphologique culturale et microscopique suivi par une série de tests qui comporte l'effet des facteurs abiotiques, des tests enzymatiques (catalase, oxydase) et le test de mannitol mobilité. Une caractérisation biochimique est réalisée par des minigalleries biochimiques (galerie API 20E et galerie API 20NE). Le statut taxonomique des isolats est déterminé par une analyse numérique en utilisant un logiciel XLstat.

Les résultats de l'étude morphologique montrent que nos isolats possèdent l'aspect morphologique des *Rhizobia* avec des cellules bâtonnet à Gram négative et des colonies blanchâtres et crémeuse avec des bords réguliers. Les souches ont une croissance rapide et acidifient le milieu YMA+BTB en 24 heures, absorbent peu le rouge Congo et modifient le pH sur GPA-BCP

Les isolats montrent une sensibilité variante aux différentes concentrations de NaCl. Le déclin de croissance est observé entre 5% et 10% pour toutes les souches. La plupart des souches peuvent croître dans un milieu salin allant jusqu'à 3% de NaCl. Pour la température les souches présentent une croissance optimale dans l'intervalle de 20°C à 37°C, alors qu'elles montrent une bonne croissance entre pH 5 à pH 8 avec un optimum entre pH 7 et 7,5.

Les souches sont mobiles et fermentent le mannitol à l'exception de la souche M1, elles sont toutes catalase positives sauf la souche S1. Le test oxydase était positives pour les souches M et négatifs pour les souches S.

L'étude numérique de la caractérisation biochimique démontre que nos isolats ont un degré de ressemblance élevé avec les souches de référence et se rapprochent beaucoup aux souches de *Rhizobium trifolii* et *Sinorhizobium melliloti*

A partir de notre recherche on a pu démontrer le rôle des galleries biochimiques dans l'identification bactérienne et leur contribution dans la taxonomie des *Rhizobia*.

Les résultats obtenus peuvent être confirmés par des études moléculaires dans d'autres travaux de futur sur les plantes légumineuses de la région de Guelma.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abd El-Ghany, E.M., Eissa, R.A., Fahmi, A.I., Nagaty, H.H., El-Zanaty, A.M. (2020). Genetic characterization of some rhizobial isolates from various legumes. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 101(3), 179–191.

Abdelmoumen, H., Filali-Maltouf, A., Neyra, M., Belabed, A., Missbah El Idrissi M. (1999). Effect of high salts concentrations on the growth of *rhizobia* and responses to added osmotica. *Journal Applied Microbiology*, 8(6), 889-89.

Aouadj, R., Saidi, S. *Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse fourragère Hedysarum pallidum Desf., poussant dans la région de Djebel Boutaleb (setif)* [Mémoire de Master Académique, Université des Frères Mentouri. Constantine. Algérie].

Atkins, P.W., Jones, L., Loverman, L. (2017). Principes de chimie. Paris : De Boeck Supérieur.

B

Baba Arbi, S. (2015/2016). *Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées Rhode et Melilotus indicus(L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla)* [Thèse de Doctorat en Microbiologie. Annaba. Algérie].

- Bakkouche, N., Bendar, A.** (2017). *Isolement et caractérisation des rhizobiums nodulant l'espèce végétale Genistacineria dans la région de Tébessa* [Mémoire de Master Académique. Université de Larbi Tébessi -Tébessa- Algérie].
- Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F.** (1993). *Practical Rhizobium Legume Technology Manual ICARDA*. Syria.
- Berg, L.R., Raven, P. H., Hassenzahl, D. M.** (2009). *Environnement*. Paris : De Boeck Supérieur.
- Berrada, H. Fikri-Benbrahim, K.** (2014). Taxonomy of the *Rhizobia*: Current Perspectives..*British Microbiology Research Journal*, 4(6), 616-639.
- Bhattacharya, C., Deshpande, B. et Pandey, B.** (2013). Isolation and Characterization of *Rhizobium sp.* from Root of Legume Plant (*Pisumsativum*) and Its Antibacterial Activity Against Different Bacterial strains. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 3(4), 138-141.
- Bougattoucha, W. Boudelaa, Y.** (2010). *L'examen cyto bactériologique des urines* [Mémoire online. Ecole de formation paramédicale de Skikda, Algérie].
- Boukhellout, S.** (2009). *Influence de la salinité sur le métabolisme azoté de l'haricot (Phaseolusvulgaris L.)* [Mémoire de Magister. Université ES-SENIA. Oran].

C

- Charchar, N., Elafri, A., Redwane, R., Halassi, I.** (2020). Land application of sewage sludge: Physiological and biochemical response of the riogrande tomato. *Land Application of Sewage Sludge J Biores Manag*, 7(2), p. 01-09.

D

Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. France: Quae.

Domergue, O. (2017). *Diversité fonctionnelle de rhizobia associés à la féverole, en agroécosystème Sud de France* [Thèse de Doctorat en Sciences de la terre et de l'atmosphère. Université de recherche Paris Sciences et Lettres. Paris. France].

Dommergues, Y., Duhoux, E., Diem, H. G. (1998). *Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux*. Montpellier : Espaces.

Domergues, Y., Mangenot, B. (1970). *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cieparis.

Drut, B. (2018). *Etude des interactions couvert végétal-organismes du sol en lien avec la biodiversité cultivée dans la parcelle : conséquences sur la fertilité du sol et le rendement des cultures* [Thèse de Doctorat en Biologie des organismes. Université Bretagne Loire. Angers].

Duhoux, N. (2004). *Biologie végétale Association et interaction chez les plantes*. Paris: IRD édition.

Duperron, S. (2017). *Les symbioses microbiennes associations au cœur du vivant*. London : ISTE Éditons Ltd 27-37 George's Road.

F

Fadlia, A., Khemissi, L. (2017). *Contribution à l'étude des partenaires symbiotiques des espèces légumineuses du genre Scorpiurus et Hedysarum* [Mémoire de Master Académique. Des Mai 1945. Guelma. Algérie].

François, J., Gaudry, M. (1997). *Assimilation de l'azote chez les plantes aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. Paris : Institut National De La Recherche Agronomique 147, rue de l'Université.

G

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994). *Method for general and molecular bacteriology*. USA: American Society for Microbiology.

H

Haddad, S., Hanane, S., Houhamdi, M. (2015). La reproduction de l'hirondelle rustique (*Hirundo Rustica*) dans un milieu urbain nord-africain: quel impact des conditions climatiques et de l'application des insecticides?. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*, 70(3), p. xxx-xxx.

Hopkins, W. G., Evrard, C. M. (2003). *Physiologie végétal*. Paris : De Boeck Supérieur.

J

Jordan, D.C. (1984) *Rhizobiaceae*. Dans N. R. Holt (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* : Vol. 1 (pp. 234-244). Baltimore : Williams et Wilkins.

M

Maâtallah, J., Berraho, E. B., Sanjuan, J., Lluch, C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *INRA, EDA Sciences*, 22(2002), 321-329.

Mazouz, C. (2017/2018). *Caractérisation biochimique des bactéries nodulants la légumineuses Trigonella foenum-gracum L* [Mémoire de Master Académique . Université des Frères Mentouri . Constantine . Algérie].

N

Nguyen, T.H.N., Vo. T. M. T., Nguyen, M. K., Pham, C. D., Phung, T. T., Doan, T. M. T., Le Thi, P. T., Nguyen, N. A. V., Ta Nguyen Minh, P., Tran Thi, K. X., Nguyen, M. Q., Nguyen, T.D. (2022). Isolation and characterization of *Rhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. from legume nodules. *HCMCOUJS-Engineering and Technology*, 12(2), 70-98.

Niste, M., Vidican, R., Puia, C, Rotar, I, Pop, R. (2015). Isolation and Biochemical Characterization of *Rhizobium Leguminosarumbv. Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti* using API 20 NE and API 20 E. *Bulletin UASVM Agriculture*, 72(1), 173-178.

O

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Rome). (1992). *Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse-rhizobium*. Italie: FAO.

P

Pagano, M.C. (2008). Rhizobia associé à l'arbre néotropical *Centrolobium tomentosum* utilisé dans la restauration riveraine. *Végétal, sol et environnement*, 54(11), 498-508.

Pomel, S. (2008). *La mémoire des sols*. France : Presses universitaires de Bordeaux.

R

Rome, S., Fernandez, M.P., Brunel, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C. (1996). *Sinorhizobium medicagoesp.* nov., isolated from annual *Medicago*. *Int J Syst Bacteriol*, 46(4), 972-980.

S

Saadallah, K., Drevon, J. J., Abdelly, C. (2001). Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*, 21(6-7), 627-634.

Schneider, A., Huyghe, C. (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables*. France: Quæ.

Somasegaran, P., Hoben, H, J. (1985). *Methods in Legume- Rhizobium Technology*. USA : United States Agency for International Development (USAID).

Stengel, P., Gelin, S. (1998). *Sol : interface fragile*. Paris : Quæ.

Suty, L. (2015). *Les végétaux : Des symbioses pour mieux vivre*. France : Quæ.

T

Torche, A., Benhizia, Y., Benguedouar, A., Gharzouli, R., Benhizia, H., Khelifi, D., Squartini, A. (2010). Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* desf. et *H. naudinianum* coss. *Sciences & Technologie*, C(32), 43-50.

V

Vincent, J. M. (1970). *The manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, United Kingdom : BlackwellScientific Publication Ltd.

Voisin, A, S., Cellier, P., Jeuffroy, M, H. (2020). Fonctionnement de la symbiose fixatrice de N₂ des légumineuses à graines : Impacts agronomiques et environnementaux. *Innovations Agronomiques*, 43(2015), 139-160.

Z

Zahran, H.H. (1999). *Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989.

Zakhia, F., De Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, 21(6-7), 569-576.

Références bibliographiques (sites Web)

- [1]. Sanchez, J. M. (2017). *Légumineuse + Bactérie Rhizobium = Symbiose*. Disponible sur : <https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-Bacterie-Rhizobium-Symbiose.html> (Consulté le : 02/05/2023).
- [2]. Márquez, A. (2021). *Rhizosphère: Définition, composition et importance*. Disponible sur: <https://www.projetecolo.com/rhizosphere-definition-composition-et-importance-268.html> (Consulté le 01/05/2023).
- [3]. Disponible sur: <https://dSPACE.univquelma.dz/jspui/bitstream/123456789/1158/1/M570.654%20ECOLOGIE> (Consulté le: 03/05/2023).
- [4]. Celle, J. (2020). *Crise de l'azote : une menace négligée*. Disponible sur: <https://thur-ecologie-transports.org/2020/10/27/lazote-en-crise/> (Consulté le: 03/05/2023).
- [5]. Préservons la nature. (2022). *Scorpiurus muricatus L./Chenillette à fruits portant des pointes*. Disponible sur: <https://www.preservons-la-nature.fr/flore/taxon/6120.html> (Consulté le : 03/05/2023).
- [6]. Herbari virtual del mediterrani occidental. (2020). *Melilotus officinalis (L.) Pall.* Disponible sur : <http://herbarivirtual.uib.es/en/general/1217/especie/melilotus-officinalis-l-pall-> (Consulté le : 03/05/2023).
- [7]. La langue française. (2023). *Définitions de « nodulation »*. Disponible sur : <https://www.lalanguefrancaise.com/dictionnaire/definition/nodulation> (Consulté le: 26/04/2023).
- [8]. Microbiologie clinique. (2021). *Identification bactérienne*. Disponible sur : www.microbiologie-clinique.com (Consulté le: 15/05/2023).
- [9]. RFSV. (2014). *Milieux sélectifs et tests biochimiques*. Disponible sur : <http://www.rfsv.fr> (Consulté le: 15/05/2023).
- [10]. Umc.edu.dz. *Manuel des travaux pratiques de Bactériologie*. Disponible sur : <https://telum.umc.edu.dz> (Consulté le: 15/05/2023).
- [11]. Epthytia. Galeries API. Disponible sur : <http://epthytia.inra.fr> (Consulté le: 15/05/2023).

- [12]. BioMérieux. *Galeries d'identification API- Diagnostic clinique*. Disponible sur : <https://www.biomerieux.fr> (Consulté le:15/05/2023).
- [13]. Wikipedia. (2023). *Guelma*. Disponible sur : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Guelma> (Consulter le: 28/03/2023).
- [14]. DB-City. *Guelma*. 2013. Disponible sur : <https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Guelma--Guelma--Guelma> (Consulté le : 28/03/2023)
- [15]. Alloprof. Définition les facteurs abiotiques. Disponiblesur : <https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/les-facteurs-biotiques-et-abiotiques-s1188> (Consulté le: 01/04/2023).
- [16]. 1 ère STL. (2005/2006). *Fiche technique. Principe. Technique. Lecture*. Disponible sur : http://stl.bgb.liberte.free.fr/microbio_fiches/catalase1.pdf (Consulté le : 26/04/2023).
- [17]. 1 ère STL. (2005/2006). *Fiche technique. Principe. Technique. Lecture*. Disponible sur : http://stl.bgb.liberte.free.fr/microbio_fiches/oxydase1.pdf (Consulté le : 26/04/2023).
- [18]. Ephytia. (2016). *Galerie API*. Disponible sur : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/23587/Veg-Di-g-Galleries-API> (Consulté le : 01/06/2023).
- [19]. MWL. (2022). *Figure de Galerie d'identification API 20E. figure de la Préparation de la galerie*. Disponible sur : <https://microbiologie-clinique.com/API.html> (consulter le: 01/06/2023).
- [20]. Wikipédia. (2023). *Normes Mc Farland*. Disponible sur: <https://fr.m.wikipedia.org> (Consulté le : 26/04/2023).

Annexes

Annexe 1 :

Milieux de culture et solutions utilisées

Composition du milieu YMB (Yeast Mannitol Agar) en g /l(Vincent, 1970)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄ 0.50	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

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

YMB	1000ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

Composition du milieu YMA+Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

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

Composition du milieu YMA+bleu de bromothymol en g /l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	10
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

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

Composition du milieu GPA (Glucose Peptone Agar) +pourpre debromocrésol g/l(Vincent, 1970)

Glucose	10
Pentone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000 ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120C° pendant 20 minutes.

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

Composition du milieu Mannitol Nitrate Mobility Medium en g/l

Mannitol	22 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes

Composition du Solution HgCl₂ acidifié 0,1%

HgCl ₂	0.1g
HCl	0.5ml
Eau distillée	100ml

Annexe 2 :

Les résultats de la mesure de la densité optique des différents tests

1. Effet de pH :

Tests \ souche	S1	S2	S3	M1	M2	M3
pH=4	0.014	0.437	0.389	0	0.339	0.03
pH=5	0.064	0.74	0.424	0.008	0.341	0.117
pH=6	0.092	0.482	0.522	0.069	0.354	0.126
pH=7	0.176	0.495	0.439	0.141	0.37	0.097
pH=8	0.233	0.487	0.41	0.148	0.325	0.141
pH=9	0.199	0.409	0.382	0.101	0.341	0.14
pH=10	0.149	0.507	0.459	0.261	0.317	0.106

2. Effet de NaCl:

Souche	S1	S2	S3	M1	M2	M3
0.10%	0.203	0.444	0.462	0.047	0.366	0.192
1%	0.178	0.491	0.435	0.218	0.334	0.306
2%	0.157	0.576	0.495	0.093	0.316	0.167
3%	0.175	0.682	0.442	0.026	0.453	0.23
5%	0.019	0.548	0.571	0.025	0.236	0.101
10%	0.022	0.052	0.008	0.022	0.022	0.07

Annexe 3 :

1. Galerie API 20 E

Préparation de la galerie API 20 E

Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Inoculation de la galerie

Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes), poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant :

- pour les tests : CIT, VP et GEL remplir tube et cupule.
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).
- pour les tests : ADH, LDC , ODC , H2S et URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C +/- 2°C pendant 18-24 heures.

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
- -Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- -Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- -Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.
- -Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
- Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
- Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification) [19].

Tableau de lecture

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA / Immédiat	
				jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	JAMES / Immédiat	
				incoloré vert pâle / jaune	rose
[VP]	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incoloré / rose pâle	rose / rouge (5)
[GEL]	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAgnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

2. Galerie API 20 NE

Préparation de la galerie API 20 NE

Principe

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSIPipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).

- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.
- Test NO₃ :
 - Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
 - Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
 - Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
 - Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc. La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive. La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.
- Test TRP :
- Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive [19].

Tableau de lecture

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

Annexe 4 :

Tableau de l'analyse numérique

API 20 E

tests	RtS1	SmM1	R1	R20	S2	S3	M1	M2
ONPG	+	+	+	+	+	+	-	+
ADH	-	-	+	+	+	+	+	+
LDC	-	+	-	+	-	-	+	+
ODC	-	+	-	-	+	-	-	-
CIT	-	-	+	+	+	+	-	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	-	+	+	-	-	-	-
TDA	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	-	-	-	-
GEL	-	-	-	+	-	-	+	+
GLU	+	+	-	+	+	+	-	+
MAN	+	+	-	-	+	+	+	+
INO	+	+	-	+	+	+	+	+
SOR	+	+	-	-	+	+	+	+
RHA	+	+	-	+	+	+	+	+
SAC	+	+	-	+	+	+	-	+
MEL	+	-	-	-	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	+	+	-	+
ARA	+	+	-	-	+	+	-	+

API 20 NE

tests	RtS1	SmM1	R1	R20	S2	S3	M1	M2
NO3	-	-	-	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	-	+	+	+	+	-
ADH	-	-	+	+	-	+	+	+
URE	+	-	+	+	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	-	-	-	+	-	+	+	+
PNG	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	-	+	+	+	+	+
ARA	+	+	-	-	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	-	-	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+
GNT	-	-	+	+	+	+	+	+
CAP	-	-	-	-	+	-	-	-
ADI	-	-	-	-	+	+	+	+
MLT	-	-	+	+	+	+	+	+
CIT	+	-	+	+	+	+	+	+
PAC	+	-	-	+	-	-	+	+