

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA – Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

Spécialité : Ecologie



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'effet du NaCl et du pH sur la croissance
des souches rhizobiennes**

Présenté par :

Mlle. Badek Nesrine et Mlle. Salhi Salma

Soutenu le : **04/07/2024**

Devant le jury composé de :

Mme. MANKOU N.	MCB	Présidente
Mme. BOULILA F.	Prof	Promotrice
M. REMDANI N.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2023 / 2024

Remerciements

Nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous donner la force et la volonté pour achever ce modeste travail.

*Nous voudrions d'abord adresser toute notre gratitude et nos profonds remerciements à madame **BOULILA F**, nous la remercions de nous avoir encadrée, orientée, conseillée et l'intérêt qu'elle a donné à ce travail et aussi pour sa disponibilité et ses avis éclairés.*

*Nous tenons à remercier également les membres de jury : monsieur **RAMDANI R** et madame **MANKOU N**, pour avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer et juger notre travail.*

Nous remercions également les enseignants de la faculté de science de la nature et de la vie pour tout le savoir qu'ils nous ont transmis durant ces années.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Salma et Nesrine

Dédicace

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude à mes chers parents, qui m'ont toujours

Aidé et soutenue toute ma vie, qui ont fait de moi tout ce que je suis aujourd'hui

Que dieu vous protège.

Mes chères et adorables sœurs : Sarah et Hassiba.

Mes deux grands mère.

À ma binôme Nesrine, dont l'engagement et l'enthousiasme ont été essentiels pour la

réussite de ce projet. Ta contribution a rendu chaque étape plus enrichissante.

Merci pour ta collaboration exceptionnelle.

A ma chère copine Mania pour sa gentillesse.

A tous les membres de ma famille sans aucune exception.

A tous mes amis de près ou de loin.

Je dédie ce mémoire à toute la promotion ECO 2023 /2024.

Salma

Dédicace

Mes chers parents, qui ont été ma source de soutien inébranlable et de motivation tout au long de mon parcours éducatif. Votre amour, vos sacrifices et vos conseils ont été essentiels pour que j'en arrive là où je suis aujourd'hui.

Que Dieu vous comble de bénédictions.

À ma binôme Salma, dont la patience et la compréhension ont été précieuses tout au long de ce travail. Ensemble, nous avons surmonté les défis et atteint nos objectifs.

Merci pour ton soutien constant.

À tous mes proches et amis, qui m'ont soutenu et encouragé à chaque étape de ce chemin académique. Votre présence et vos encouragements ont été une source d'inspiration. Merci du fond du cœur pour votre soutien indéfectible.

Nesrine

Liste des tableaux

Tableau I :	les souches de <i>Brady rhizobium</i> sp. étudiées ainsi que les souches de références.	19
Tableau II :	Volume contenant 10^7 cellules/ml utilisé comme inoculum standard	22

Liste des Figures

Figure 01 :	cycle de l'azote	04
Figure 02 :	Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique	05
Figure 03 :	photo indiquant les nodules de <i>Genista</i> sp vue à la loupe	11
Figure 04 :	Processus de nodulation rhizobium -légumineuses	13
Figure 05 :	Les étapes du Processus de la nodulation racinaires chez les légumineuses	16
Figure 06 :	Les milieux de culture préparer	20
Figure 07 :	Aspect de colonies en croissance sur YMA	21
Figure 08 :	Cellule Malassez	22
Figure 09 :	Spectrophotomètre utilisé pour évaluer la densité optique	23
Figure 10 :	Effet du NaCl sur la croissance des souches testées.	26
Figure 11 :	Effet du pH sur la croissance des souches testées.	27

Liste des Abréviations

Nod : Gène de nodulation

YMA : Yeats Mannitol Agar

YMB : Yeats Mannitol Broth

Table de Matières

Liste des Figues

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. L'azote	03
I.1.1. Cycle d'azote	03
I.1.2. Transformation de l'azote dans la nature	04
I.1.3. Microorganisme fixateurs d'azote	05
I.1.3.1. Fixateurs libres	05
I.1.3.2. Fixateurs symbiotiques	06
II. Légumineuses	06
II.1 Classifications des Légumineuses	07
II.2. Tibus des <i>Genisteeae</i>	08
II.3. Intérêts des Légumineuses	10
III. Rhizobia	10
III.1 Classification des Rhizobia	11
III.2 Bradyrhizobium.....	12
IV. Symbiose rhizobia-légumiseuse-	12
IV.1. Intérêts de la symbiose rhizobia-légumineuse	13

IV.2 Processus de nodulation	14
IV.2.1. Pré-infection.....	14
IV.2.2. Infection	15
IV.2.3. Développement et formation des nodules	15
V. Facteurs influençant la symbiose rhizobia-légumineuse.....	17

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Matériels biologiques	19
II.2. Méthodes	20
II.2.1. Préparations des milieux de cultures	20
II.2.2. Revivification des souches	20
II.2.3. Préparation des pré-cultures	21
II.2.4. Préparation des inoculums.....	21
II.2.5. L'effet du pH et du NaCl sur la croissances des souches étudiées.....	23
II.2.6. L'effet du pH sur la croissance des souches étudiées.....	23
II.2.7. L'effet du NaCl sur la croissance des souches étudiées	24

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. L'effet du ph sur la croissance des souches testées.....	25
III.2. L'effet du NaCl sur la croissance des souches.....	26
Conclusion.....	28

Référence bibliographique

Annexes

Introduction

Introduction

L'azote est un constituant essentiel des acides aminés et des protéines, et est donc un élément minéral indispensable pour tous les organismes vivants. Cet élément constitue le principal facteur limitant la croissance des plantes, qui ne peuvent l'utiliser que sous forme combinée (nitrate, ammonium ou urée). En conséquence, l'azote est un facteur limitant majeur de la production agricole (**Robert et al. 2005**).

La famille des légumineuses est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones en raison de sa diversité et de ses nombreuses applications. Elle comprend un vaste nombre d'espèces utiles à l'Homme dans divers domaines comme le domaine industrielle, alimentaire et médicinale.

La tribu des *Genisteeae* appartenant à la famille des *Fabaceae*, est essentiellement méditerranéenne (**Polhill, 1976**). Elle possède une grande importance écologique, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées en dominant de nombreuses communautés végétales (**Lopez Gonzalez, 2001**).

L'intérêt majeur des légumineuses réside dans leur capacité à établir une relation symbiotique avec les bactéries du sol appelées rhizobia (**Chen et al., 1995**). Ces bactéries fixent l'azote atmosphérique en le convertissant en formes utilisables par les plantes.

Les bactéries telles que les rhizobiums sont d'une importance considérable en agriculture et en foresterie en raison de leur capacité à établir une symbiose avec les plantes de la famille des légumineuses. Cette symbiose permet aux légumineuses de jouer un rôle crucial dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols (**Ndoy, 1999**).

Le processus de fixation de l'azote entre les légumineuses et les bactéries rhizobium est une relation symbiotique bénéfique pour les deux partenaires. Cependant, cette relation peut être perturbée par des facteurs abiotiques tels que le pH et la salinité (**Graham, 1992**).

Cette étude a pour but de rechercher la croissance des souches de *Bradyrhizobiums.sp* sous l'effet de différents pH et de différentes teneurs en NaCl. Les souches concernées ont été isolées à partir de nodules racinaires de plusieurs légumineuses appartenant à la tribu *Genisteeae*, de différents sites géographiques et écologiques, de tribu *Genisteeae* à savoir *Retama sphaerocarpa* et *R.reatam*, *Cytisu*, *Calicotome* (**Boulila, 2009 ; Ahnia, 2014**).

Ce document est constitué de trois chapitres : une synthèse bibliographique qui présente des généralités sur les partenaires rhizobia et légumineuses et leurs interactions (Symbiose rhizobia-légumineuses), chapitre matériel et méthodes qui montrent l'approche adoptée dans cette étude, et le dernier chapitre comporte les résultats obtenus et leurs discussions.

Synthèse Bibliographique

I. Azote

L'azote (N₂ ou diazote) est un gaz incolore et inodore qui représente environ 78% du volume total de l'atmosphère terrestre (**Hopkins, 2003**).

C'est un élément essentiel pour toutes les formes de vie découvertes sur notre planète (**Hopkins, 2003**). Il est le 4^{ème} élément nutritif des plantes, constituant essentiel du protoplasme (**Madigan et al. 2007**), des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes.

D'autre part, cet élément stimule chez les végétaux le développement et l'activité racinaire, favorisant l'utilisation des hydrates de carbone, l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (**Babo, 2002**).

Cependant l'insuffisance ou la carence de cet élément se traduit chez les plantes par une chlorose, un nanisme, une stérilité,...etc (**Tourte et al., 2005**).

I.1 Cycle d'azote

L'azote total est typiquement divisé en trois principaux ensembles : l'atmosphère, le sol (avec son eau) et l'azote présent dans la biomasse. Les interactions complexes entre ces trois ensembles sont désignées sous le nom de cycle de l'azote (**Hopkins, 2003**).

Le cycle de l'azote est un ensemble de processus qui transforment l'azote gazeux en substances organiques et le réintroduisent dans la nature (**figure 1**). Il s'agit d'un cycle continu qui peut être décomposé en quatre types de réactions où les microorganismes jouent un rôle essentiel (**Tourche, 2006**).

Le cycle de l'azote commence par sa fixation biologique. Certains champignons et bactéries libèrent des composés d'azote organique dans l'environnement, qui sont ensuite utilisés par les plantes. En parallèle, d'autres microorganismes participent à l'ammonification, convertissant l'azote présent dans la matière végétale morte en ammoniac, ce qui le rend à nouveau disponible pour le processus de nitrification.

Les nitrates et les composés d'ammoniac peuvent être directement assimilés par les bactéries, les plantes et les champignons. Enfin, l'azote est libéré de la masse organique d'un écosystème grâce au processus de dénitrification (**Mulder, 2009**).

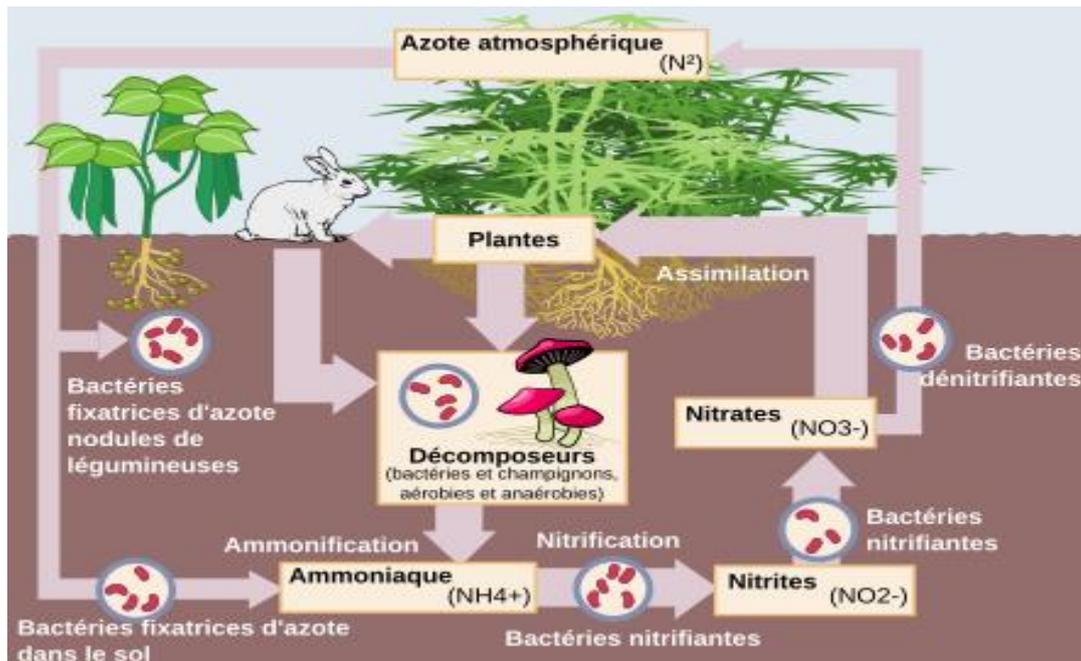


Figure 01 : Cycle d'azote (Pujic, 2009)

I.1.2. Transformation de l'azote dans la nature

- **Ammonification**

Ce processus contribue à la décomposition de la matière organique. Il est effectué à la fois en présence et en absence d'oxygène, principalement par des bactéries hétérotrophes et d'autres microorganismes tels que les champignons et les levures, qui utilisent la matière organique comme source d'énergie et de carbone. Le stade final de l'ammonification est la formation d'ions ammonium (NH_4^+) (Montuelle, 2003).

La fixation d'azote atmosphérique par des bactéries libres du sol, un processus distinct de l'ammonification, peut également contribuer à la production d'ions NH_4^+ dans le sol.

- **Nitrification**

La transformation de l'ammoniac (NH_3) ou de l'ammonium (NH_4^+) en nitrate (NO_3^-) est appelée nitrification. Les bactéries terrestres convertissent l'ammoniac ou l'ammonium en nitrite (NO_2^-), puis d'autres bactéries terrestres oxydent le nitrite en nitrate. Ce processus de nitrification fournit de l'énergie à ces bactéries, appelées bactéries nitrifiantes (Raven, 2009).

• Dénitrification

Ce processus anaérobie, appelé dénitrification, implique la réduction du nitrate en formes volatiles d'azote telles que l'azote gazeux (N_2) et l'oxyde d'azote (N_2O), qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.*, 2007).

De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus, notamment *Bacillus*, *Proccoccus* et *Pseudomonas* (Madigan *et al.* 2007).

I.1.3 Microorganisme fixateur d'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique implique que diverses bactéries utilisent l'enzyme nitrogénase pour convertir l'azote moléculaire N_2 en ammoniac (figure 2). Cette forme d'azote peut ensuite être incorporée dans des composés organiques tels que les acides nucléiques, qui sont présents dans les bactéries et les plantes associées (Unkoick *et al.*, 2008).

La symbiose rhizobium-légumineuse est responsable de plus de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (Bory *et al.* 1993).

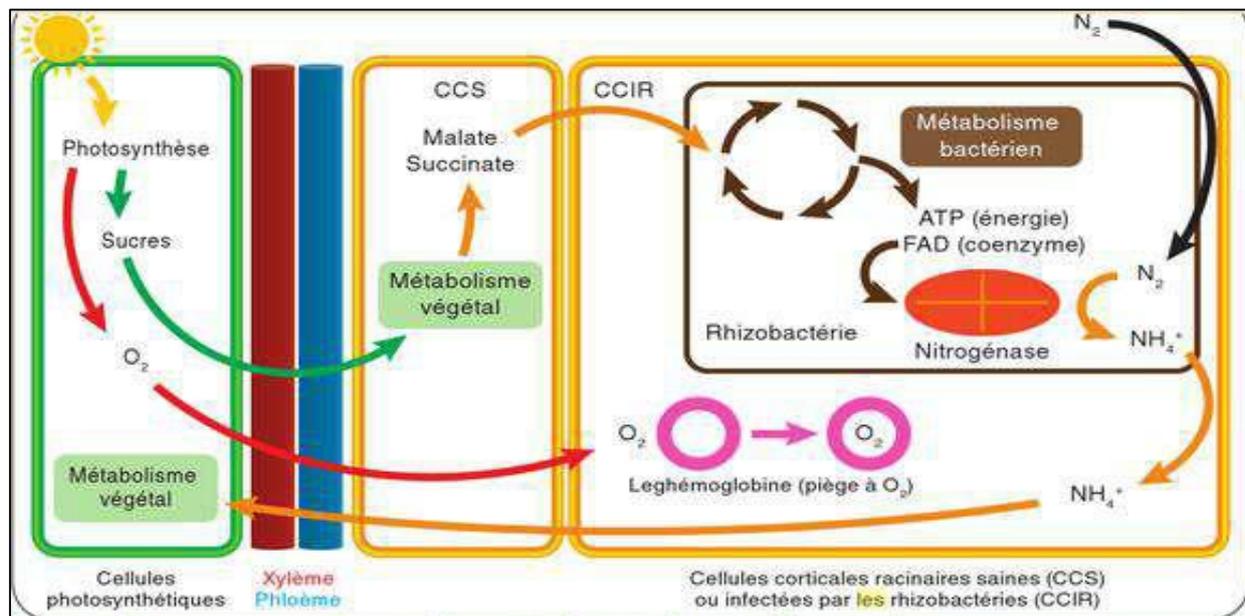


Figure 2 : Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (SUTY, 2015).

I.1.3.1 Fixateurs libres

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont largement répandues. Elles se retrouvent dans les sédiments marins et d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces, ainsi que dans le tube digestif de divers animaux. Bien que ces microorganismes libres soient abondants, la plupart d'entre eux ont une croissance lente et, sauf pour les espèces photosynthétiques, ils ont

tendance à se trouver dans des habitats riches en carbone organique. Étant donné que ces bactéries doivent consacrer une proportion importante de leur énergie respiratoire à la fixation de l'azote, leur capacité de croissance disponible est souvent limitée (**Hopskins, 2003**).

Les fixateurs libres incluent une grande diversité de genres, notamment des bactéries aérobies chimio-organotrophes telles que *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, et *Diazotrophicus*, des bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium*, des bactéries aérobies facultatives telles que *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, ainsi que des cyanobactéries telles que *Synechococcus* (**Doberiner et al., 1995 ; Kennedy et al., 1997**).

I.1.3.2 Fixateurs symbiotiques

La réduction de l'azote requiert une quantité importante d'énergie. En effet, 16 molécules d'ATP qui sont nécessaires pour réduire une seule molécule d'azote. C'est pour cette raison que les systèmes les plus efficaces de fixation de l'azote sont des symbioses entre des bactéries fixatrices et des organismes photosynthétiques capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (**DENARIE, 2000**).

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques apporte chaque année environ 120 millions de tonnes d'azote dans les cycles biologiques, ce qui représente plus du double de l'apport provenant des bactéries libres (**Davet, 1996**).

Les espèces réellement symbiotiques fixatrices d'azote sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On retrouve principalement des rhizobiums, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (**Pelmont, 1995**).

Ces bactéries jouent un rôle crucial dans la croissance des plantes agricoles (**Tortora et al. 2003**). Cependant, la symbiose la plus cruciale du point de vue écologique et agronomique est celle qui associe les bactéries du sol, telles que les rhizobiums aux légumineuses (**Denaire, 2000**).

II. Légumineuse

Le monde des légumineuses est vaste et diversifié. La famille des légumineuses regroupant environ 750 genres et 19 300 espèces, offre une diversité remarquable allant des herbes naines des régions arctiques et montagneuses aux arbres imposants des forêts tropicales. On y trouve aussi bien des plantes herbacées dans les zones tempérées que des arbustes et des lianes (**Andrews, 2016**).

Un élément clé caractérise les légumineuses : la présence de nodosités sur leurs racines. Ces structures hébergent des bactéries symbiotiques appelées rhizobia, capables de fixer l'azote atmosphérique et de le transformer en ammoniac, une forme assimilable par la plante, essentielle à sa nutrition azotée (**Raven et al., 2000**).

II.1. Classification des légumineuses

Selon **Quezel et Santa (1962)**, la famille des légumineuses est classée comme suit :

Règne : Eucaryote

Phylum : *Planta*

Sous règne : Végétaux (phanérogame)

Embranchement : Spermaphytes (plantes à graines)

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : *Rosida*

Ordre : Fabales

Famille : *Leguminosae*

La famille des *Leguminosae* est très diverse avec trois sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae*, et *Papilionoideae* (**Doyle et Luckow, 2003 ; Geptset al, 2005**).

- *Caesalpinioideae*

La plupart des *Caesalpinioideae* sont des arbres ou des arbustes tropicaux à subtropicaux, caractérisés par des fleurs pseudo-papilionacées. Cette sous-famille compte environ 150 genres et 2200 espèces. Seulement 23% des espèces examinées dans cette sous-famille ont montré des nodulations (**Maxted et Bennett., 2001**).

- *Mimosoideae*

La plupart des membres de cette sous-famille sont des arbres tropicaux portant de petites fleurs régulières. Elle englobe environ 62 genres et environ 2500 espèces. Seulement 10% des espèces examinées ont révélé des nodulations (**Maxted et Bennett, 2001**).

- *Papilionoideae*

Cette sous famille est la plus abondante, renferme plus de 12600 espèces dans 429 genres (**Judd et al, 2002**). Ces plantes sont principalement herbacées, pouvant être vivaces ou annuelles, et elles sont largement réparties à travers le monde (**Rasanen, 2002**).

Les *Papilionoideae* sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisum sativum L*) et le haricot (*Phaseolus vulgaris L*) ; mais aussi pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage tels que la luzerne (*Medicago sativa L*) et le Sulla (*Hedysarum coronarium L*) (**FAO, 1996**).

II.2 Tribu des *Genisteae*

Dans, cette étude, nous nous intéressons aux légumineuses de la tribu de *Genisteae* (Adnas) qui est définie par (**Polhill, 1976**) et réorganisés par (**Bisby, 1981**) et qui exprime une tribu diversifiée de 20 genres et environ 450 espèces.

Les *Genisteae* sont majoritairement des arbustes, particulièrement distribués en Méditerranée. Elles sont écologiquement très importantes, non seulement en raison de la grande diversité des espèces, mais également grâce à leur capacité à coloniser les forêts dégradées et les zones déboisées, contribuant ainsi à la restauration de nombreuses communautés végétales.

Selon **Quezel et Santa (1962)**, il existe plusieurs genres des *Genisteae* : *Retama*, *Cytisus*, *Calicotome*, *Genista*...

- **Genre *Retama***

Dans les paysages arides du Maghreb, un arbuste se distingue par sa silhouette élancée et ses rameaux fins et effilés : le *Retama*, connu localement sous le nom de "Rtème". Cette plante, décrite par **Quezel et Santa (1962)**, s'adapte remarquablement aux conditions désertiques où l'eau est précieuse.

Le *Retama* se présente généralement sous forme d'arbuste, pouvant atteindre une hauteur de 1 à 4 mètres. Ses rameaux, longs et flexibles, évoquent des joncs, d'où son surnom "joncailles". Cette caractéristique lui permet de maximiser sa surface d'exposition à la rosée et à l'humidité ambiante, des ressources essentielles dans les environnements arides **Quezel et Santa (1962)**

En Algérie le genre *Retama* compte trois espèces : *R. sphaerocarpa (L.) Boiss (figure 3)*, *R. reatam Webb*, et *R. monosperma (L.) Boiss. (Quezel et Santa, 1962)*.

- **Genre *Cytisus***

Le genre *Cytisus*, regroupant les genêts et les cytises, s'étend bien au-delà de la Méditerranée. On le retrouve dans des régions géographiquement distinctes, comme le nord et le sud de l'Afrique, l'Europe occidentale et centrale, la mer Noire et la Turquie (**Quezel et Santa, 1962**).

Ces arbustes ou arbrisseaux dressés, souvent épineux, se distinguent par leur floraison abondante et leurs feuilles alternes. Les stipules, petites excroissances à la base des feuilles, sont généralement réduites ou absentes. Les fleurs, souvent jaunes ou blanches, s'épanouissent en grappes terminales ou latérales, attirant les regards par leur beauté simple et élégante.

D'après **Quezel et Santa (1962)**, six espèces composent ce genre diversifié : *C.purgans*, *C.linofolius*, *C.fontanesii*, *C.monspessulanus*, *C.arboreus*, *C.villosus*.

- **Genre *Calicotome***

Dans les paysages ensoleillés du bassin méditerranéen, un arbuste épineux attire le regard par ses fleurs jaunes éclatantes : le *Calicotome*. Ces plantes, qui peuvent atteindre 1 à 2 mètres de hauteur, se distinguent par leur feuillage trifolié et leur adaptation remarquable aux environnements arides.

Elles jouent un rôle important dans les écosystèmes méditerranéens, notamment en stabilisant les sols et en enrichissant les terrains pauvres en azote grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec des bactéries spécifiques (**Mokhtari, 2012**).

- **Genre *Genista***

Le genre *Genista*, décrit pour la première fois par **LINNE** en 1753, s'impose comme un élément clé de la flore méditerranéenne, européenne et nord-africaine. Avec plus de 120 espèces à son actif, il représente le deuxième grand genre au sein de la tribu des *Genistea*. On le retrouve ainsi dans l'est, le sud et le grand Sahara algérien, mais aussi dans tout le bassin méditerranéen, en Europe, en Turquie, en Russie et au Caucase (**Quezel et Santa, 1962**).

Le genre *Genista* se compose d'arbustes épineux et non épineux, la plupart formant des maquis sclérophylles (**Martins et al, 2005**). Ces maquis, caractérisés par des feuilles coriaces et résistantes à la sécheresse, jouent un rôle crucial dans la protection des sols et la préservation de la biodiversité.

En Algérie, dans ce genre se trouve un véritable lieux de tranquillité, comptant 23 espèces dont 11 endémiques, comme *Genista ferox*, *Genista numidica* et *Genista tricuspidata* (**Maire, 1987**).

II.3 Intérêt des légumineuses

Les légumineuses sont des sources importantes de divers nutriments tels que les protéines, les minéraux et les lipides. Elles sont également utilisées comme fourrage vert ou comme plantes de pâturage (**Vascoucelos, 2016**).

- **Intérêt agronomique**

Les légumineuses, ont un intérêt agronomique comme engrais vert (**Borget, 1989**). Les légumineuses contribuent à la fertilisation des sols grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. L'agriculture biologique vise à produire une alimentation de qualité tout en préservant les ressources naturelles (**Van Bol, 2000**).

- **Intérêt alimentaire**

Les légumineuses constituent une source importante de protéines végétales pour l'alimentation humaine, représentant 32% des protéines et 32% des matières grasses consommées. Elles fournissent également une part significative des protéines et des lipides pour l'alimentation animale, contribuant respectivement à 38% et 21% de ces nutriments (**Neyra, 1992**).

- **Intérêt économique**

Les légumineuses sont utilisées comme des aliments, mais aussi participent dans la fabrication des gommages, teintures, résines, huiles, en plus leurs bois est utilisé en construction et pour chauffage (**Wathman, 1967**). À noter aussi la réduction des coûts et bilans énergétiques suite à la diminution d'utilisation des engrais azotés dans le domaine agricole.

III. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries qui possèdent une forme bâtonnet de Gram négatif, et strictement aérobie (**Jordan, 1984**). Ces bactéries forment une symbiose (**figure 3**) avec les légumineuses sur les quelles forme les nodules racinaires (**Fanck, 1989**). Ces bactéries peuvent être présentes soit librement dans le sol, soit en symbiose avec une plante légumineuse (**Maidek et al, 1994**).

Les rhizobia sous forme végétative mesurent généralement de 1,2 à 3 µm de longueur et de 0,5 à 0,9 µm de largeur. Ils possèdent un flagelle polaire unique ou plusieurs flagelles péri-triches.

Les rhizobia dotés de 2 à 6 flagelles se distinguent par leur croissance rapide, tandis que ceux avec un seul flagelle polaire ou subpolaire ont une croissance plus lente. La présence des flagelles leur confère une mobilité (Worner, 1992).

À l'intérieur des nodules, les rhizobia se transforment en bactéroïdes, adoptant une forme irrégulière et une taille généralement plus grande que celle de leur forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

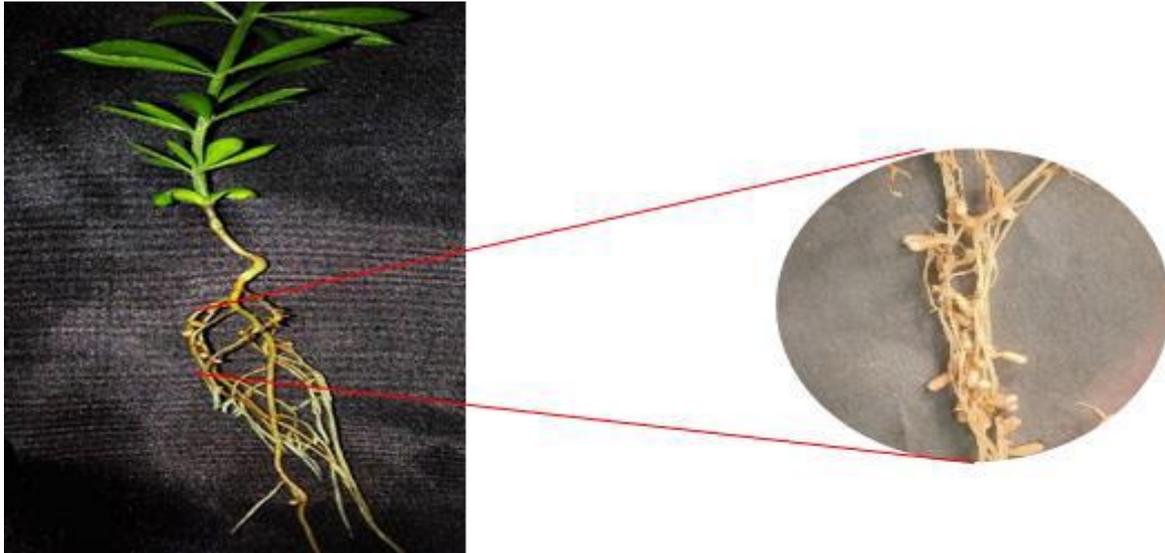


Figure 3 : photo indiquant les nodules de *Genista* sp vue à la loupe (Boudehouche, 2021)

III.1. Classification des rhizobia

Les rhizobia appartiennent au domaine *Bacteria*, au phylum *Proteobacteria*. Ils se répartissent en 514 espèces et 13 genres (Wier, 2016), ces genres sont :

- *Rhizobium* qui contient 111 espèces.
- *Mesorhizobium* qui contient 46 espèces
- *Ensifer* (formerly *Sinorhizobium*) contient 21 espèces.
- *Bradyrhizobium* contient 40 espèces.
- *Burkholderia* contient 120 espèces.
- *Azorhizobium* contient 2 espèces.
- *Microvirga* contient 16 espèces.

- *Phyllobacterium* contient 11 espèces.
- *Ochrobactrum* contient 18 espèces.
- *Methylobactérieum* contient 52 espèces.
- *Cupriavidus* contient 16 espèces.
- *Devosia* qui contient 22 espèces.
- *Shinella* qui contient 7 espèces.

III.2 *Bradyrhizobium*

Nous nous intéressons dans cette étude au genre *Bradyrhizobium* qui a été caractérisé par Jordan en 1982 et comprend des bactéries dites "à croissance lente" c'est-à-dire le temps de génération supérieur à 6 heures. Ces bactéries infectent de nombreuses légumineuses. Initialement, ce genre ne comprenait qu'une seule espèce, *Bradyrhizobium japonicum*, nodulant le soja (*Glycine max*). Par la suite, deux nouvelles espèces ont été définies sur la base d'hybridation ADN/ADN : *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendal *et al.*, 1992) et *Bradyrhizobium liaoningensis* (Xu *et al.*, 1995).

De nombreuses autres souches de *Bradyrhizobium* ont été isolées de différentes légumineuses, mais leur distinction en espèces n'a pas toujours été définie, les regroupant sous le terme *Bradyrhizobium* sp. suivi du nom de leur plante d'isolement (Dupuy *et al.*, 1994). Une caractérisation de différentes souches de *Bradyrhizobium* par comparaison de plusieurs techniques moléculaires a révélé l'existence de 11 génotypes différents, dont trois correspondent aux souches reconnues et huit sont très distincts (Dommergues *et al.*, 1998).

En 2018, Stepkowski a inventorié 50 espèces appartenant au genre *Bradyrhizobium*. En Algérie, l'équipe interaction plantes microorganismes du laboratoire d'écologie Microbienne de l'université de Béjaia a décrit une espèce *Bradyrhizobium algeriense* (Ahnia *et al.*, 2018).

IV. Symbiose rhizobia-légumineuses

La symbiose rhizobia-légumineuses est un exemple fascinant d'association étroite entre une plante et une bactérie, aboutissant à un partenariat bénéfique pour les deux partenaires mais aussi pour l'environnement. Cette relation unique débute par un dialogue moléculaire complexe entre la légumineuse et la bactérie rhizobium (Perret *et al.* 2000). La bactérie stimule la formation de nodules racinaires (Figure 04) chez la plante, structures qui abritent les bactéries différenciées

en bactéroïdes (**Glibison et al, 2008**). Ces bactéroïdes possèdent la capacité extraordinaire de fixer l'azote atmosphérique, le transformant en une forme assimilable par la plante sous forme d'ammoniac.

Ce processus de fixation biologique de l'azote constitue un apport essentiel pour la plante, lui permettant de se développer même dans des sols pauvres en cet élément crucial. En contrepartie, la légumineuse fournit aux bactéroïdes les sucres nécessaires à leur croissance et à leur activité (**Boddy et al, 2000**).

Au-delà de la relation directe entre les deux partenaires, la symbiose rhizobia-légumineuses joue un rôle écologique majeur. En effet, l'azote fixé par les légumineuses enrichit le sol, profitant aux cultures ultérieures et réduisant ainsi le besoin d'engrais azotés chimiques polluants. Cette association naturelle contribue donc à la fertilité des sols et à la durabilité des systèmes agricoles.

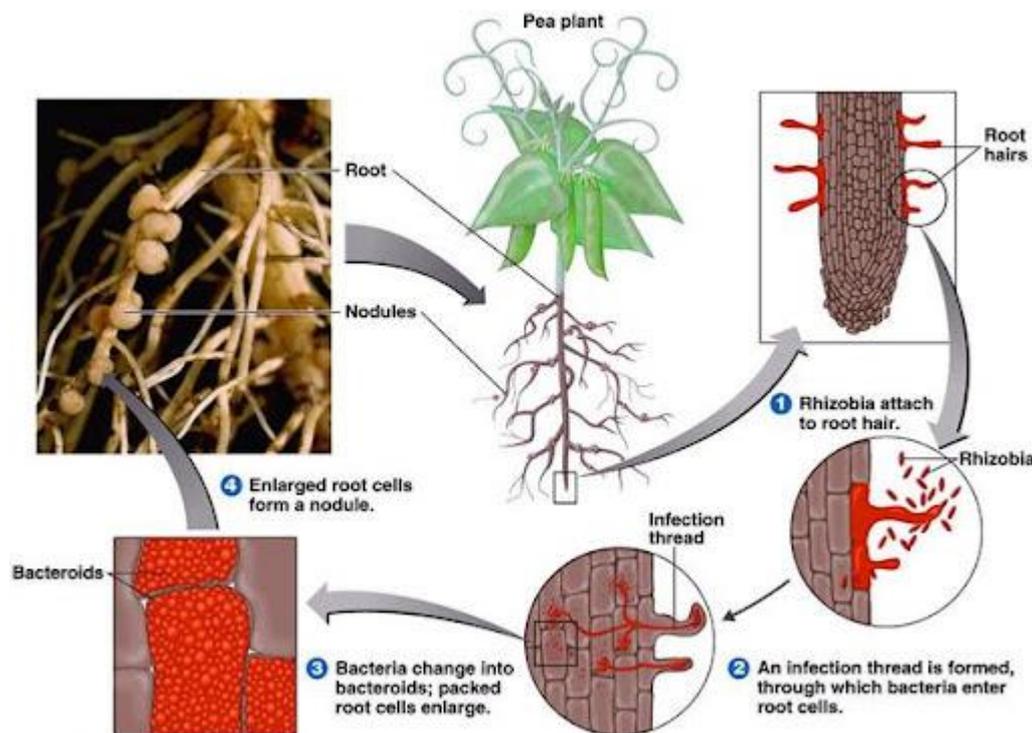


Figure 04 : Processus de nodulation rhizobium -légumineuses (El-Hilali, 2006).

IV.1 Intérêt de la symbiose rhizobia-Légumineuses

La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses, avec sa capacité exceptionnelle à fixer l'azote atmosphérique, constitue une solution prometteuse pour accroître la production alimentaire dans diverses régions du monde. Elle a le potentiel de contribuer de manière significative à l'augmentation de la productivité agricole, tout en permettant des économies substantielles sur les coûts en devises et en énergie liés aux engrais coûteux (**Neyra, 1997**). Ainsi, cette symbiose

fournit la plus grande quantité d'azote biologique dans les systèmes d'exploitation agricole (O'hara, 2002).

Elle contribue également à restaurer la fertilité des sols, à réhabiliter les terres dégradées et à limiter la pollution des nappes phréatiques par les nitrates (Neyra, 1997).

Les rhizobia et les légumineuses établissent une association symbiotique qui représente l'une des interactions les plus cruciales entre une plante et un microorganisme (Madigan et Martinko, 2007).

L'interaction entre les légumineuses et les rhizobia induit la formation d'un organe spécialisé sur les racines qualifié de « nodule », au sein duquel les bactéries symbiotiques différenciées en bactéroïdes fixent l'azote atmosphérique.

IV.2. Processus de nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Dhane, Fitouri, 2011 ; Khan *et al*, 2010).

Le développement de ce processus se déroule en plusieurs étapes (Figure 05) : pré-infection, infection, développement et formation des nodules (Sanchez *et al*, 1991).

IV.2.1. Pré-infection

La pré-infection est la phase préliminaire cruciale qui détermine la spécificité symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses. Ce processus commence par l'échange de signaux moléculaires, principalement des flavonoïdes sécrétés par le système racinaire de la plante hôte. Ces flavonoïdes sont reconnus par les rhizobia présents dans le sol, déclenchant une série de réponses cellulaires chez les bactéries (Subramanian *et al*. 2007).

Une fois les flavonoïdes perçus par les rhizobia, ces derniers activent la transcription des gènes *nod*, conduisant à la production de facteurs *nod*. Ces facteurs *nod* sont des molécules signal clés qui facilitent la reconnaissance et l'attachement des rhizobia aux poils racinaires de la plante hôte.

Cet échange de signaux moléculaires permet d'assurer que seuls les rhizobia compatibles avec la légumineuse spécifique pourront initier le processus de nodulation, garantissant ainsi une symbiose efficace et bénéfique pour les deux partenaires (Yang *et al*, 2010).

IV.2. Infection

L'infection commence dès que les rhizobia s'attachent aux racines de la plante hôte. Ce processus d'infection se déroule via deux voies principales :

- ✓ **Voie Intracellulaire** : Les rhizobia pénètrent à travers les poils absorbants ou des blessures présentes sur les racines.
- ✓ **Voie Intercellulaire** : Les bactéries entrent dans les cellules radiculaires via des filaments infectieux (**Eestrada-Navarrete, 2016**).

Une fois à l'intérieur des cellules, les rhizobia se différencient en bactéroïdes, des formes spécialisées capables de fixer l'azote atmosphérique (**Spraink et Blodergoen, 1998**).

Enfin, la croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées, permettant la formation complète des structures nécessaires à la symbiose et à la fixation de l'azote.

IV.3 Développement et formation des nodules

L'infection rhizobia, étape cruciale de la symbiose entre légumineuses et bactéries, est un ballet cellulaire fascinant où chaque protagoniste joue un rôle précis. Tout commence par une prolifération de cellules au niveau du cortex de la racine infectée. Cette activité intense donne naissance à une structure appelée pré-nodule, un regroupement de cellules corticales colonisées par les bactéries fixatrices d'azote (**Geurts et Franssen, 1996**).

Par la suite, un primordium nodulaire prend forme, initié par de nouvelles divisions cellulaires à proximité du pré-nodule. Ce primordium deviendra le nodule mature, un véritable havre de paix pour les bactéries symbiotiques (**Hopkins et al. 2003**).

Les bactéries, libérées dans les cellules hôtes, se transforment en bactéroïdes, des formes spécialisées capables de fixer l'azote atmosphérique, un trésor pour la plante. Le nodule mature se développe, composé de plusieurs lobes nodulaires, chacun doté d'une vascularisation centrale et d'un cortex divisé en trois zones distinctes :

- **Zone méristématique** : Cette zone, située au centre du nodule, assure la croissance continue du nodule en produisant de nouvelles cellules.
- **Zone d'infection** : C'est ici que les bactéries rhizobia s'infectent et se différencient en bactéroïdes.

- **Zone de fixation d'azote** : Dans cette zone, les bactéroïdes fixent l'azote atmosphérique et le transmettent à la plante sous une forme assimilable.

La croissance des nodosités se poursuit dans les zones infectées, assurant la pérennité de la fixation de l'azote, un processus essentiel pour la croissance et le développement de la légumineuse (Perry *et al*, 2004 ; Babararbi, 2016 ; Affati et Kerdouci, 2020). Ce ballet cellulaire complexe, orchestré par une communication moléculaire subtile, illustre la remarquable adaptation des légumineuses et des rhizobia à une collaboration étroite et bénéfique pour les deux partenaires.

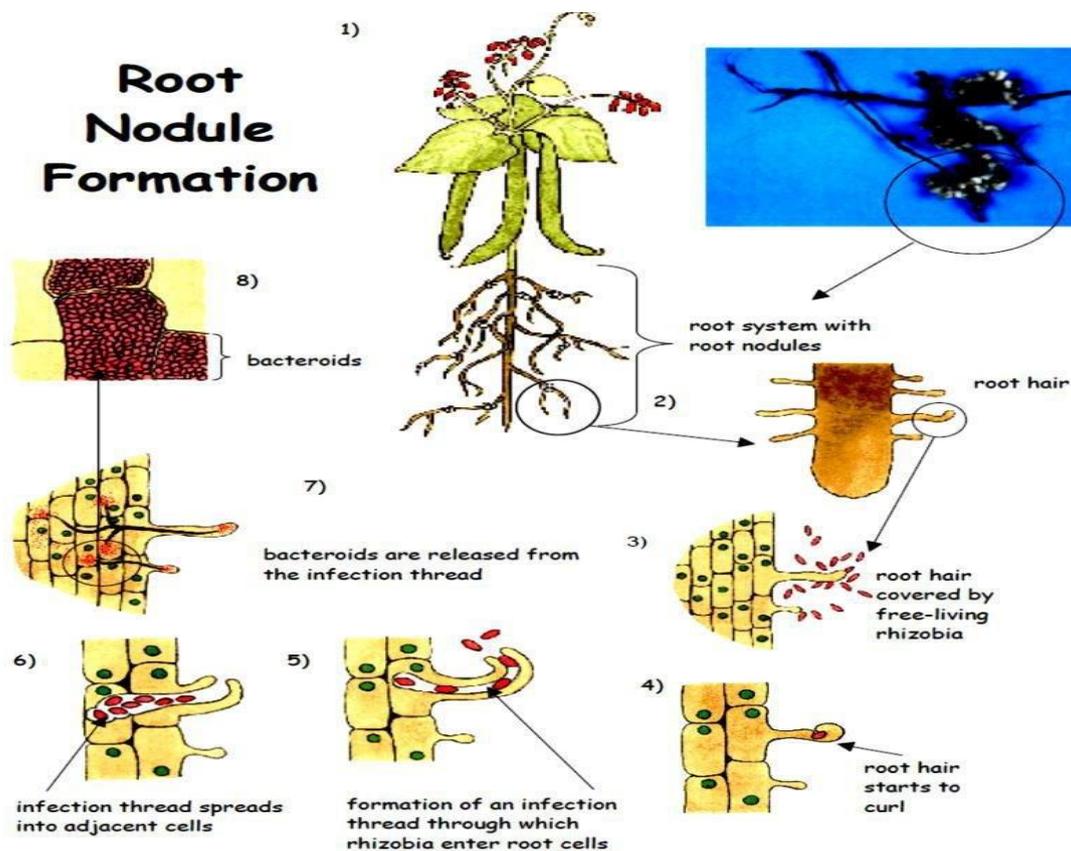


Figure 05 : Etapes du Processus de la nodulation racinaires chez les légumineuses (Burdass, 2000).

V. Facteurs influençant la symbiose rhizobia- Légumineuses

Le bon déroulement de la symbiose rhizobia-légumineuses peut être altéré par divers facteurs biotiques et abiotiques, ce qui peut entraver la croissance et le développement des plantes.

▪ Effet de NaCl

Des niveaux élevés de sel dans le sol peuvent inhiber la croissance des rhizobia et la formation des nodosités sur les racines des légumineuses, ce qui réduit la capacité des plantes à fixer l'azote atmosphérique. Cela peut entraîner une diminution de la productivité des cultures légumineuses dans les sols salins (**Domergue, 2006**).

▪ pH du sol

Les pH extrêmes influencent sur les deux partenaires (rhizobium et légumineuse). Cependant d'après **Fitouri (2011)**, la plupart des légumineuses nécessitent un pH du sol neutre à légèrement acide pour établir une symbiose efficace.

L'acidité élevée du sol peut affecter la solubilité des éléments minéraux et entraîner des perturbations dans la nutrition minérale. Cette acidité influe d'une part sur le développement de la plante hôte et d'autre part sur l'efficacité des rhizobia, ce qui peut provoquer une diminution de la nodulation (**Munnus, 1977**).

▪ Stress salin

La salinité influence le processus d'infection (**Payekapay, 2006**), ainsi que le développement et le fonctionnement des nodules. (**RAO et al, 2002**). En premier lieu, l'activité des nodules est plus sensible au stress salin que la formation des nodules elle-même (**Payakapong et al, 2006**).

▪ Température

Des températures élevées au niveau du système racinaire affectent l'infection des racines par les bactéries et la fixation symbiotique de l'azote chez plusieurs espèces de légumineuses. Ces températures élevées retardent la nodulation et la localisent en profondeur, ce qui réduit ou inhibe l'activité de la nitrogénase et la fixation symbiotique (**Zahran, 1999**).

La température critique pour la fixation symbiotique chez cette légumineuse est l'une des plus élevées, se situant généralement entre 35 et 40°C (**Michiels et al, 1994**).

▪ Acidité

L'acidité du sol limite à la fois la fixation symbiotique de N₂ et la survie à long terme des rhizobia dans les sols (**Zahran, 1999**).

- **Métaux lourds**

Les métaux lourds sont toxiques même à de faibles doses. Ils ont un impact négatif sur la croissance des plantes et la fixation de l'azote par les microorganismes du sol (**Gusmão Lima et al, 2005**).

- **Effet des pesticides**

Les pesticides ont un impact sur le sol et altèrent la structure biochimique des microorganismes, ce qui nuit à la symbiose entre la plante et les bactéries (**Rennie et al, 1985**).

Matériel et Méthodes

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet du pH et du NaCl sur la croissance des souches de *Bradyrhizobium sp* isolées des nodules racinaires de légumineuses appartenant à la tribu *Genisteeae*. Cette recherche a été menée au sein du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaïa.

II-1. Matériel biologique

Pour mener cette étude, nous avons pris quatre souches de *Bradyrhizobium*. Il s'agit d'un représentant de chaque collection appartenant au laboratoire d'écologie microbienne (LEM). Ces 4 représentants ont été isolés à partir de nodules racinaires de légumineuses arbustives de la tribu *Genisteeae* de différents sites géographiques.

Deux souches de références ont été choisies du même genre. Il s'agit de *Bradyrhizobium algeriense* RST89 et *B. japonicum* USDA6.

Le tableau I récapitule origine des souches étudiées, y compris les souches de références, ainsi que leur plante hôte.

Tableau I : les souches de *Bradyrhizobium sp.* étudiées ainsi que les souches de références

Souches	Plante hôte	Références
<i>B.algeriense</i>	<i>Retama sphaerocarpe</i>	Ahnia et al.2018
<i>B.japunicum</i>	<i>Glycine max</i>	Jordan 1982
<i>Bradyrhizobium</i> S1	<i>Genista</i> sp.	Etude en cours
<i>Bradyrhizobium</i> S2	<i>Calicotome</i> sp.	Etude en cours
<i>Bradyrhizobium</i> S3	<i>Cytisus villosus</i>	Ahnia et al., 2014
<i>Bradyrhizobium</i> S4	<i>Retama</i>	Boulila et al., 2009

II.2. Préparation des milieux de culture

Les souches ont étéensemencées sur milieu YMB et YMA (**Figure 06**) conformément à la méthode préconisée par Vincent (1970) (**annexe 1**). Le milieu liquide a servi à la réalisation des différents tests physiologiques.

L'autoclavage des milieux de culture a été fait selon la stérilisation classique des milieux de cultures à 120°C pendant 20 minutes.



Figure 06 : Milieux de culture YMA et YMB

II.3. Revivification des souches

Les souches bactériennes préalablement conservées à une température de -20°C ont étéensemencées comme milieux de culture sur des boîtes de Pétri contenant YMA (**figure 07**)

Ces boîtes ont ensuite été incubées à une température de 28°C pendant une période de 6 jours.

L'objectif de cette démarche était de réactiver les souches et de stimuler leur métabolisme afin qu'elles puissent être utilisées pour les analyses et les expériences ultérieures.



Figure 07 : Aspect de colonies en croissance sur YMA.

II.4. Préparation de pré-culture

Nous avonsensemencé les souches bactériennes étudiées en transférant des échantillons de ces souches à partir des boîtes de Pétri vers des tubes à essai. Ces tubes contenaient 5 millilitres de milieu de culture YMB, un environnement spécifique pour la croissance des bactéries.

Ces pré-cultures ont été placées dans un environnement contrôlé à une température de 28°C pendant 6 jours. Après cela, ces pré-cultures ont été utilisées pour ensemenecer des flacons contenant 100 millilitres de milieu de culture YMB.

Ces cultures ont été incubées à une température de 28°C pendant 6 jours. Cette étape permet de favoriser la croissance des bactéries.

II.5. Préparation des Inoculum

Pour préparer l'inoculum standard des souches de *Bradyrhizobium sp.* étudiées ainsi que les deux souches de référence, nous avons fait un comptage à l'aide de la cellule de Malassez (**voir figure 08**), qui est composée de 100 rectangles d'égales surfaces. Nous avons déposé une suspension bactérienne entre la cellule de Malassez et la lamelle, puis nous avons dénombré les bactéries par rectangle. Enfin, nous avons ramené le résultat obtenu par ml de liquide. Ce qui nous a permis de déterminer le volume (**Tableau 2**) qui correspond à un inoculum standard choisi qui est de 10^7 cellules par millilitre.



Figure 08: cellule Malassez

Tableau 2 : Volume contenant 10^7 cellules/ml utilisé comme inoculum standard

Souches	Volume (ul)
<i>B.algeriense</i>	250
<i>B.japunicum</i>	155
<i>Bradyrhizobium</i> S1	195
<i>Bradyrhizobium</i> S2	250
<i>Bradyrhizobium</i> S3	200
<i>Bradyrhizobium</i> S4	180

II.6. Effet du pH et du NaCl sur la croissance des souches étudiées

Dans cette partie, nous avons examiné l'impact de deux facteurs abiotiques à savoir le pH et le NaCl sur la croissance des six souches de *Bradyrhizobium sp.* L'inoculation a été effectuée avec une suspension bactérienne contenant environ 10^7 cellules /ml.

Estimation de la croissance bactérienne est alors effectuée après 6 jours d'incubation à 28°C grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm (voir figure 9).



Figure 9 : Spectrophotomètre utilisé pour évaluer la densité optique

Pour chaque test, nous avons considéré trois exemplaires pour garantir une précision optimale.

II.6.1. Effet du pH sur la croissance des souches étudiées

L'influence du pH sur la prolifération de six souches bactériennes a été investiguée en utilisant le milieu de culture YMB.

Pour ce faire, une gamme de pH allant de 4 à 9 a été explorée, avec trois répétitions indépendantes réalisées pour chaque souche et chaque valeur de pH.

Les tubes contenant 5 millilitres du milieu YMB ont étéensemencés par une suspension bactérienne contenant 10^7 cellules dénombrées avec la cellule de Malassez.

Ces cultures ont été placées dans un environnement contrôlé à une température de 28°C et ont été laissées incubées pendant 6 jours. Après cette période d'incubation, la croissance bactérienne a été évaluée au spectrophotomètre en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 620 nanomètres.

Cette méthode permet de quantifier la quantité de matière bactérienne présente dans le milieu de culture, ce qui nous a permis d'évaluer l'impact du pH sur la prolifération des souches bactériennes (**annexe 2**).

II.6.2. Effet du NaCl sur la croissance des souches étudiées

La tolérance de souches étudiées au NaCl a été testée sur un milieu YMB contenant des concentrations croissantes de NaCl au milieu de culture YMB, à savoir 100Mm, 200Mm, 300Mm, 400Mm et 500Mm.

Chaque concentration a été testée trois fois pour chaque souche, ce qui signifie que chaque souche a été exposée à chaque concentration de NaCl trois fois. Les cultures ont été placées dans un environnement contrôlé à une température de 28°C et ont été laissées incubées pendant 6 jours.

La croissance bactérienne a été évaluée au spectrophotomètre en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 620 nanomètres.

Cette méthode permet de quantifier la quantité de matière bactérienne présente dans le milieu de culture, ce qui nous a permis d'évaluer l'impact du NaCl sur la croissance des souches bactériennes (**annexe 3**).

Pour comparer les résultats, un témoin négatif non inoculé a été utilisé dans les trois tests. Ce témoin permet de déterminer les variations naturelles du milieu de culture et de ne pas inclure ces variations dans les résultats de croissance des souches.

Résultats et discussion

III-1. Effet du NaCl sur la croissance les souches étudiées

Après incubation des souches étudiées pendant 06 jours à 28 °C sous l'effet des différentes concentrations en NaCl, nous avons obtenu les résultats illustrés dans la **figure 10**. Ces résultats montrent que la croissance de la majorité des souches diminue avec l'augmentation de la concentration du NaCl à l'exception des souches *Bradyrhizobium sp* S1 et S2. En effet, la croissance de *Bradyrhizobium sp* S3 et S4 ainsi que les souches de référence *B.algeriense* et *B. japonicum* est sensible aux NaCl. Ces résultats sont en accord avec Ahnia *et al.*, (2018) et Jordan (1982) qui montrent que *B.algeriense* et *B.japonicum* sont sensibles à la salinité.

La tolérance des souches *Bradyrhizobium sp* S1 et S2 à la salinité a été déjà indiquée par les travaux menés par **Boudehouche (2021)** sur des souches de *Bradyrhizobium sp.* isolées de *Genista tricuspidata* et *ferox*. En effet cette auteure a mis en évidence une tolérance exceptionnelle des souches *Bradyrhizobium sp.* à des concentrations de NaCl allant jusqu'à 513 mM, un niveau de salinité bien supérieur à celui que la plupart des rhizobia peuvent tolérer.

Ces résultats montrent l'importance des souches *Bradyrhizobium sp* S1 et S2, tolérantes à des concentrations élevés en NaCl, qui pourraient être utilisées dans des projets de révégétalisation des sols dégradés et salins.

La variabilité de la tolérance aux sels au sein même d'une même espèce et d'un même genre, comme le souligne **Kassem *et al.* (1985)**, met en lumière la diversité des mécanismes d'adaptation mis en place par les rhizobia pour faire face au stress salin.

Miller et Wood (1996) ont indiqué que les rhizobia sont des bactéries sensibles à la salinité, mais elles peuvent en tolérer des concentrations élevées. Cette tolérance est en rapport avec des mécanismes d'adaptation qui permettent de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs.

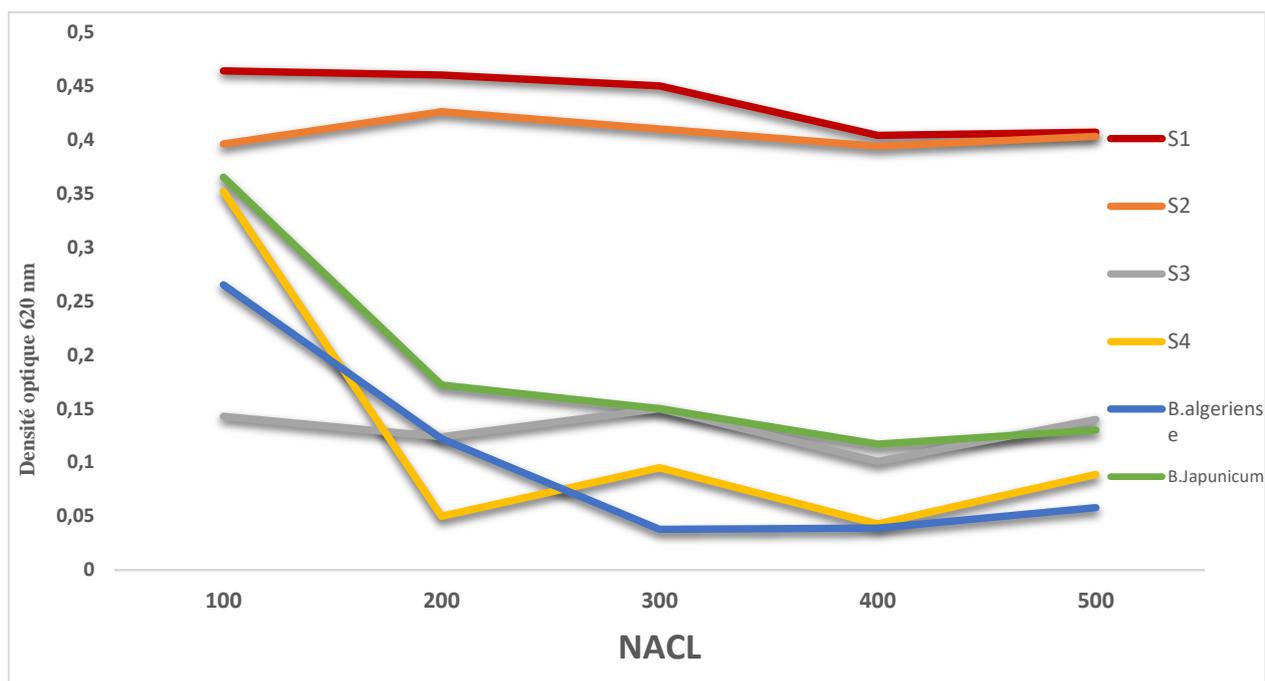


Figure 10: Effet du NaCl sur la croissance des souches étudiées

III-2. Effet du pH sur la croissance les souches étudiées

L'effet du pH sur la croissance des souches rhizobiennes étudiées est présenté dans la figure 11. Ces résultats montrent que la plupart des souches ont une capacité de croissance à tous les pH étudiés. En effet, les souches *Bradyrhizobium* sp. S1, S2, et S3 ont une bonne croissance à différents pH avec une préférence à l'acidité. Aussi, les souches de référence *B.algeriense* et *B.japonicum* présentent une croissance entre pH4 et pH7 avec un optimum à pH7 et au-delà, cette croissance diminue considérablement. Ce résultat est en accord avec les travaux de Jordan (1982) et Ahnia et al., (2018) qui ont décrit respectivement *B.japonicum* et *B.algeriense*.

Ces travaux sont en accord également avec ceux de Boudhouche (2021) qui a étudié l'effet du pH sur la croissance des *Bradyrhizobium* sp. isolés de *Genista tricuspidata*, *G. ferox* et *G. numidica*. Cette auteure a constaté que ces souches présentent une croissance optimale à pH 7 et une croissance réduite de moins de 20 % à pH 9.

La souche *Bradyrhizobium* sp. S4 présente un comportement différent des autres souches. En effet, elle présente un optimum de croissance entre pH 5 et 7 et ne supporte pas les pH extrêmes

Cependant, Van Rossum et al. (1994) ont également rapporté que les *Bradyrhizobium* à croissance lente peuvent tolérer des pH élevés, jusqu'à 10, tandis qu'elles sont sensibles aux pH acides.

D'autres auteurs comme **Coventry et Evan (1989)** ont indiqué également que l'acidité est plus néfaste que l'alcalinité pour les rhizobia.

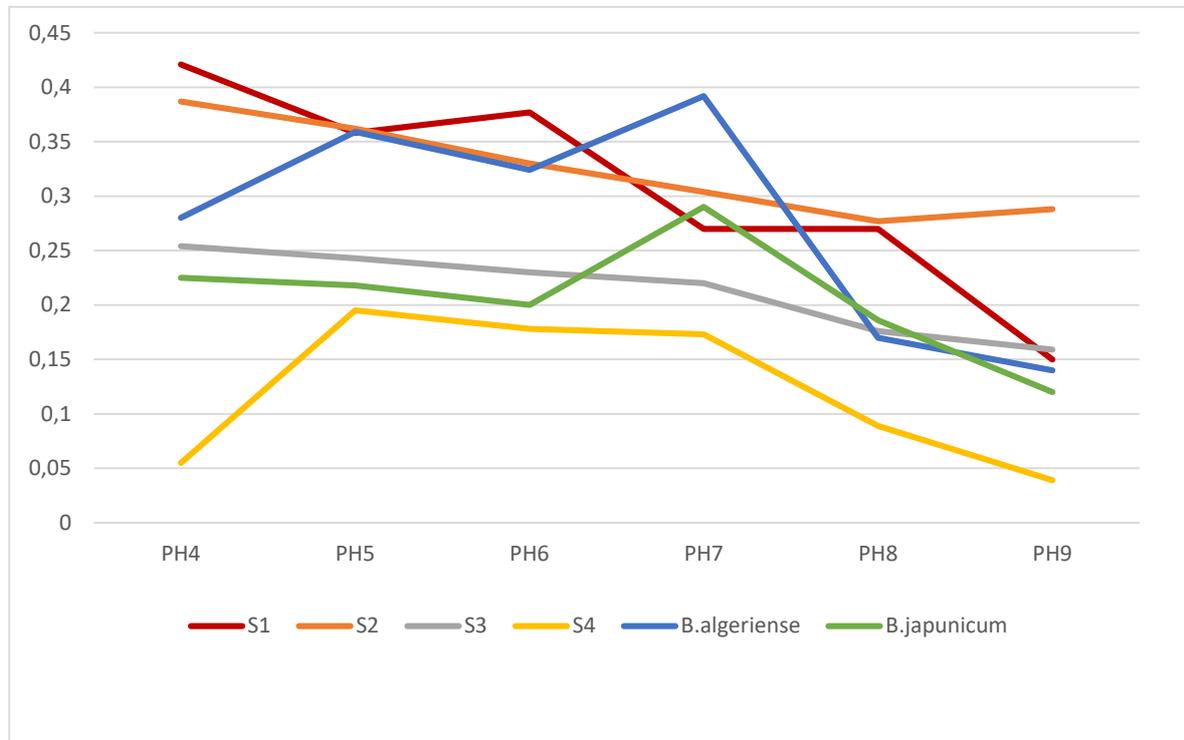


Figure 11 : Effet du pH sur la croissance des souches testées.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons recherché l'effet du pH et du NaCl sur la croissance de quatre représentants de 4 collections *Bradyrhizobium* appartenant au laboratoire d'écologie microbienne. Ces souches ont été isolées de nodules racinaires de *Retama*, *Calicotome*, *Genista*, *Cytisus* appartenant à la tribu de *Genisteeae*. Deux souches de référence ont été prises à titre de comparaison.

Les tests de tolérance au NaCl ont montré que la croissance des *Bradyrhizobium sp* S3 et S4 ainsi que les souches de référence *B.algeriense* et *B. japonicum* est affectée sous l'effet du NaCl. Cependant, les deux souches *Bradyrhizobium* S1 et S2 peuvent tolérer des concentrations élevées en NaCl allant jusqu'à 500mM. Ces résultats sont prometteurs et pourraient être utilisées dans des projets de révégétalisation des sols dégradés et salins.

L'étude de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiées a révélé une capacité remarquable d'adaptation des souches *Bradyrhizobium sp.* S1, S2 et S3 à un large spectre de pH. Contrairement aux souches de référence *B.algeriense* et *B.japonicum* dont la croissance est optimale à pH neutre (pH 7), les souches *Bradyrhizobium sp.* étudiées présentent une préférence pour un environnement acide, avec une croissance maintenue sur l'ensemble des pH testé.

En perspective, cette étude peut être élargit sur des souches de rhizobia isolées de légumineuses des régions arides et semi-arides afin d'avoir plus de possibilité de trouver des souches tolérantes à la salinité.

Références bibliographiques

Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., Salmi, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. «*Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains.» (Antonie Van Leeuwenhoek), n° 105, 1121–1129. (2014).

Ahnia, H., Bourebaba, Y., Duran, D., Boulila, F., Palacios, J.M., Rey, L., RuizArgueso, T., Boulila, A., Imperial, J. Argueso, T., A. Boulila, et J. Imperial. «*Bradyrhizobium algeriense* sp.nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria.» (Syst. Appl. Microbiol), n° 41, 333–339. (2018).

Andrews M., Andrews M.E. (2016). Specificity in legume-Rhizobia symbiosis. Faculty of agriculture and life sciences. 1. pp 1-7.

Babo B V. (2002). Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae. Doctor. Université Laval, Québec

Borget M. (1989). "Les légumineuses vivrières". Edition Maisonneuve et Larousse. Paris 162p.

Boudehouche, W., Parker, M. A., & Boulila, F. (2020). Relationships of *Bradyrhizobium* strains nodulating three Algerian *Genista* species. *Systematic and applied microbiology*, 43(3), 126074

Boulila F. (2009). Caractérisation phénotypique et génotypique des rhizobia isolés de *Retama*. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira. Bejaia. 85p.

Boulila Farida, Depret Geraldine, Boulila Abdelghani, Belhadi Djellali, Benallaoua Said, Laguerre Gisele. (2009) *Retama* species growing in different ecological–climatic areas of north eastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology*. 32, 245–255.

Burdass D. (2000). *Rhizobium* foot nodules and Nitrogen fixation. *Soc. Gen Microbiol*. 16p.

Chen, W.X., Wange, S. Y., Ly, Y.B., Chen, X.Q., et Li, Y. (1995) Characteristics of *rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium.

Coventry, D. R., & Evans, J. (1989). Symbiotic nitrogen fixation and soil acidity. *Soil acidity and plant growth.*, 103-137.

Davet P., 1996. vie microbienne du sol et production végétale. Ed INRA. Paris. 147 p.

- Denarie J., 2000.** Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs des plantes fourragères et à gazon. Ed INRA. Paris. 13p
- Dhane Fitouri, 2011 ; Khan et al.,2010.** Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L.) et sélection de souches Rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique, Tunisi. Microbes for Legume Improvement. Springer Wien New York. 535p
- Domergue, O., 2006.** Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. P78.
- Doyle, J.J. et Luckow, M.A. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900–10.
- El-hilali, I. (2006),** la symbiose *rhizobium-lupin* : Biodiversité des Micro symbiotes et mise en évidence d'une multi-infection Nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de doctorat université Mohammed Agdal Maroc, PP, 9.
- Estrada-Navarrete G., Cruz-Mireles N., Lascono R., Alvarado-Affantranger., Hernández-Barrera A., Barraza A., Olivares J.E., Arthikala M-K., Cárdenas L., Quinto C., Sanche F. (2016).** An Autography-Related kinas essential for the symbiotique relationship between *Phaseplus Vulgaris* and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi the plant cell. **28.** 2326p
- FAO. (1996).** Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO.
- Fitouri dhane S, Ben Jeddi F, Rezgui S, Mhandi R (2011)** Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante de *rhizobium sullae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L) sous déficit hydrique. *J. Appl Biosci* :3642-3651
- Frank, B., 1889.** Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsc. Bot. Ges.* 7 pp 332 -346.
- Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F & Young N.D. (2005).** Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137: 1228–1235.
- Geurts R., Franssen H. (1996).** Signal transduction in *Rhizobium* induced nodule formation. *Plant.Physiol.* **112.** pp 447-453
- Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C., 2008.** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* 42: PP 413–441

- Graham, J., 1992.** Salt tolerance of plants. *Science Progress.* 76: 273-285
- Gusmao-Lima, A. I., Figueira, E., De Almeida, M. P. et Pereina, S. I. A. (2005).** Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum*, bv. *Viciae*. Glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol* 51:701-715.
- Hopkins, W.G., 2003 :** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119.
- Jordan D.C., 1984.** Family III: Rhizobiaceae. In: Krieg N.R. et Holt J.C (Eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Williams et Wilkins. Baltimore. USA. pp 234-244.
- Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. & Stevens P. (2001)** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Ed 1: DEBOECK, p. 84-336.
- Kassem, M., Capellano, A., & Gounot, A. M. (1985).** Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 1(1), 63-75.
- Lopez Gonzalez G., 2001.** Los arboles arbustos de la Península Ibérica Islas Baleares. Ed. Mundi Prensa, Madrid, Spain
- Madigan M., Martink J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes 11e édition. Edition Person Education France. p. 599-601, 676-681
- Maire R., 1987.** La flore de l'Afrique du Nord. Les légumineuses, Lechevalier Ed., Paris, XVI : 123-193.
- Maxted N et Bennett, S.J. (2001).** Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean.* Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39:132.
- Montuelle B., 2003.** Qualité et gestion des sédiments d'eau douce. éléments physicochimiques et biologiques. Ed. cemagref
- Mulder K.F., 2009.** L'ingénieur et le développement durable, presses de l'université du Québec. Ecole de technologie supérieure. P 18-19.
- Munns D.N., 1977. Madigan M., Martink J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes. Edition : Person Education France. PP, 599-601. *Salinity and related factors.* Bose (Ed). PP, 236.

- Navarro A., Polajnard M., Imperiala J., Ruiz-Argüeso T. (2011).** Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.***34.** pp 207-215
- Ndoye, I., (1999).** Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *Acacia nilotica* var. *andansonii* et var. *tomentosa* (mimosoideae, sous famille des acacieae). Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier (France). PP,1
- Neyra M. (1997).** Des microbes aux services des écosystèmes. Microbiologie. Cahier ORSTOM. Dakar. 11. pp. 201-205.
- Neyra M. (1992)** Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote légumineuse/Rhizobium. 190
- O'Hara G.W., Howieson J.G., Graham P.H. (2002).** Nitrogen fixation and Agricultural Practice. Ed. Elsevier. pp. 391-420.
- Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W., Borthakur D., (2006).** Identification of two clusters of genes Involved in salt Tolerance in Sino rhizobium Sp. Strain BLB. *Symbiosis.* 41:47-51.
- Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement adaptation physiologique. Ed Dunod. France.
- Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement : adaptation physiologique. Vol 2. Office des Publications Universitaires, PP 897-906
- Perret X., Staehelin C., Broughton WJ. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 180–201
- Michiels J.C. Verreth and Vanderleyden J., 1994.** Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. *Appl Environ Microbiol.* 60:1206-1212.
- Miler K.J., Wood J.M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50. pp 101-136.
- Perry J.J., Staley J.T & Lory S. (2004).** Microbiologie. Edition Dunod, Paris
- Polhill R.M., 1976** *Genisteeae* (Adnas) Ben tham and related tribes (leguminosa). *Bot. Syst.* .1:143-368.

- Pujic P., Normand P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutura* 298 pp 26-29.
- Quezel, P., et S. Santa.** « Nouvelle Flore d'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales. » (2 Tomes, Editions CNRS,) (1962-1963).
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (2000).** Biologie végétale. Édition : de Boeck université. 6ème Édition. Paris-France. 968p.
- Raven P.H., Evert R., Eichhorn S.E., 2007.** Biologie végétale. 2ème Ed. De Boeck. France. pp 653-660.
- Raven P.H., Berg L.R., Hassenzahl D.M., 2009.** Environnement. Ed De Boeck. Belgique. 94p
- Räsänen L.A., (2002).** Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia and Prosopis. Thèse de doctorat. Université d'Helsinki. Finland. 28p
- Rennie, R. J., Howenp, R. J., Swenson, T. A., and Frisvold, G. H. A. 1985.** The effect of seed-applied pesticides on growth and N₂ fixation in pea, lentil and fababean. *Can. J. Plant Sci.* 65:23-28.
- Robert E., Ricklefs G., Miller L., (2005).** Ecologie. Ed. De Boeck. Paris. 214p
- Sanchez-Conizaresa C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sanchez-Jiménez P., Navarro A., Polajnar M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T. (2011).** Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 34. pp 207-215
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc pp 450.
- Spraink H.P., Blodergoen M.R. (1998).** Genes and signal molecules involved in the rhizobia. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1. 353p
- Torche A., 2006.** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*.

- Tourte Y., Bordonneau M., et Tourte C., 2005.** Le monde des végétaux. Edition Dunod, Paris.
- Van Bol V., 2000.** Azote et agriculture durable, approche systémique en fermes pilotes.
Thèse de doctorat : Laboratoire d'Écologie des Prairies, Université Catholique de Louvainla-Neuve (Belgique).13p.
- Vincent J.M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Wathman F. (1967).** Fleurs du bassin méditerranéen. Ed. Paris.VI.24p.
- Weir B.S. (2016).** The current taxonomy of rhizobia. NZ rhizobia. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.
- Werner D., 1992.** Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.
- Yang S., Tang F., Gao M., Koishnam H.B., Zhu H. (2010).** R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. PNAS.**107**. 18735p.
- Zahran HH. (1999).** Rhizobium legume Symbiosis and Nitrogen fixation under severe condition and in an Arid climate. Microbiology and Molecular Reviewes Vop 63. N°4. Pp.968-989.

Annexe

Liste des annexes

Annexe 1 :

Composition des milieux de cultures (pour 1 litre) (Vincent, 1970).

Milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA) en g/l :

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSo ₄ 7H ₂ O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Agar.....	15g
H ₂ O.....	1000ml

Ajuster le PH à 7

Milieu Yeast-Mannitol-Broth (YMB) en g/l :

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSo ₄ 7H ₂ O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
H ₂ O.....	1000ml

Ajuster le PH à 7

Annexe 02 :

La moyenne des DO obtenue aux différents pH

	PH4	PH5	PH6	PH7	PH8	PH9
S1	0,421	0,358	0,377	0,27	0,27	0,15
S2	0,387	0,362	0,33	0,304	0,277	0,288
S3	0,254	0,243	0,23	0,22	0,176	0,159
S4	0,055	0,195	0,178	0,173	0,089	0,039
B.algeriense	0,28	0,359	0,324	0,392	0,17	0,14
B.japunicum	0,225	0,218	0,2	0,29	0,186	0,12

Annexe 03 :

La moyenne des Do obtenue aux différentes concentrations de NaCl

	100	200	300	400	500
S1	0,464	0,46	0,45	0,404	0,407
S2	0,396	0,426	0,41	0,394	0,403
S3	0,143	0,124	0,15	0,101	0,14
S4	0,352	0,05	0,095	0,043	0,089
B.algeriense	0,265	0,122	0,038	0,039	0,058
B.Japunicum	0,365	0,172	0,15	0,117	0,13

Résumé

Dans cette étude, 6 souches de *Bradyrhizobium sp.* isolées de nodules racinaires de légumineuses arbustes et 2 souches de référence (*B. algeriense* et *B. japonicum*) ont été utilisées pour étudier l'effet du pH et de la salinité sur leur croissance.

L'étude de l'effet du NaCl a révélé une sensibilité marquée de la majorité des souches à l'augmentation de la concentration en NaCl, à l'exception des souches *Bradyrhizobium sp.* S1 et S2 qui ont montré une remarquable tolérance au sel, tandis que les souches de référence se sont avérées sensibles.

L'étude de l'effet du pH a révélé une capacité remarquable d'adaptation des souches *Bradyrhizobium sp.* S1, S2 et S3 à un large spectre de pH, contrairement aux souches de référence dont la croissance est optimale à pH neutre. Les souches *Bradyrhizobium sp.* étudiées présentent une préférence pour un environnement acide et ont maintenu une croissance sur l'ensemble des pH testés.

Mot clés : *Bradyrhizobium*, légumineuse, *Genisteeae*.

Abstrat

In this study, six strains of *Bradyrhizobium sp.* isolated from root nodules of leguminous shrubs and two reference strains (*B. algeriense* and *B. japonicum*) were used to investigate the effect of pH and salinity on their growth.

The study of the NaCl effect revealed a marked sensitivity of the majority of strains to the increase in NaCl concentration, except for *Bradyrhizobium sp.* strains S1 and S2 which showed remarkable salt tolerance, while the reference strains were found to be sensitive.

The study of the pH effect revealed a remarkable adaptation capacity of *Bradyrhizobium sp.* strains S1, S2 and S3 to a wide range of pH, unlike the reference strains whose growth is optimal at neutral pH. The *Bradyrhizobium sp.* strains studied showed a preference for an acidic environment and maintained growth over all pH tested.

Keyword: *Bradyrhizobium*, leguminous, *Genisteeae*.

ملخص

B. تم استخدام عزلات معزولة من العقيدات الجذرية لبقوليات الشجيرات وسلالتين مرجعيتين (*Bradyrhizobium sp.* على 6 سلالات من بكتيريا *algeriense* و *B. japonicum*) لدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني والملوحة على نموها.

كشفت دراسة تأثير كلوريد الصوديوم عن حساسية ملحوظة لدى غالبية السلالات لزيادة تركيز كلوريد الصوديوم، باستثناء سلالات براديريزوبيوم التي أظهرت تحملاً ملحوظاً للملح، في حين أن السلالات المرجعية كانت وجدت أنها حساسة. S1 و S2 sp

عند نطاق واسع من الأس و S3 و S2 و S1 *Bradyrhizobium sp.* كشفت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني عن قدرة ملحوظة على التكيف لنبات. أظهرت *Bradyrhizobium sp.* الهيدروجيني، على عكس السلالات المرجعية التي يكون نموها مثاليًا عند درجة الحموضة المحايدة. سلالات الدراسة تفضيلاً للبيئة الحمضية وحافظت على النمو عبر جميع مستويات الأس الهيدروجيني التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: البراديريزوبيوم، البقوليات، الجينيسيتيا.