

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des sciences biologiques de l'environnement
Spécialité : Toxicologie industrielle et environnemental



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme de master II en
toxicologie industrielle et environnemental

Thème

Effet de la température et de la
salinité sur la croissance des souches de
Rhizobia isolées de Genesteae

Présenté par :

M^{lle}. Mazouzi Nylina

M^{lle}. Madi souad

Devant le jury composé de :

M.^r Hamlat Mourad

M^{me}. Mankou Nadia

M^{me} Boulila Farida

MAA

MAA

MAA

Président

Examinatrice

Promotrice

Année universitaire : 2020 / 2021

Remerciement

On remercie dieu de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce modeste travail.

*Tout d'abord on tient à remercier madame **Boulila Farida** notre promotrice pour la qualité de son encadrement, pour sa patience et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire sans elle ce travail ne serait pas aussi riche.*

Nos sincères remerciements sont adressés aux membres du jury Monsieur Hamlat Mourad et Madame Mankou Nadia qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail, nous les en remercions profondément.

Nos remerciements s'adresse à tous les membres de l'équipe du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia pour leur accueil et leur soutien morale et leur encouragement.

On remercie également tous nos professeurs pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué au cours de ces cinq années passées à l'université de Bejaia.

Enfin, dans le souci de n'oublier personne on tient à remercier tous ceux qui nous ont soutenu, encouragés de près ou de loin à réaliser ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents qui m'ont toujours poussée et motivé dans mes études, qui m'ont toujours aidé et m'ont conseillé pour choisir toujours le bon chemin ; je les remercie pour leur sacrifice et leur effort pour une éducation digne, c'est à cause d'eux que je suis arrivée à cette étape. Que Dieu vous garde pour moi.

A mon seule et unique frère " Ghiles " malgré tu es loin de moi mais Tu étais toujours à mes coté merci pour tout.

A mon amie d'enfance ma sœur « Manel " je te remercie beaucoup pour ton soutien durant toute mes années d'études.

A mes amies Lydia, Sihem et Rosa avec qui j'ai passé les plus belles années de ma vie.

A ma binôme Souad pour toute sa patience et compréhension tout au long de ce travail.

A l'homme de ma vie qui a été toujours à mes coté et qui ma soutenue toute au long de ce travail.

Enfin, à toute personne qui m'a aidé et encouragé soit de près ou de loin.

Nylina

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A MA CHERE MAMAN

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez porté depuis mon enfance jusqu'à que le bon Dieu vous a choisi à ces cotés.

Que Dieu vous accorde le paradis

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Ce travail est dédié à mon père, qu'il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa fille qui prie toujours que le bon Dieu, le Très Haut, lui accorde la santé, bonheur et une longue vie.

Souad

Liste des abréviations

C° : Degré Celsius

g/l : gramme par litre

ml : milli-litre

mM :milli-Molaire

N : azote

NaCl : Chlorure de sodium

nm : nanomètre

Nod : Gène de nodulation

pH : potentiel hydrogène

% : Pourcentage

T°: Température

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Broth

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 01 :	Cycle de l'azote	5
Figure 02 :	<i>Retamasphaerocarpa</i> (Boulila, 2009)	8
Figure 03 :	<i>Cytisusvillosus</i> (Ahnia, 2015)	9
Figure 04 :	<i>Calicotomespinosa</i> (Salmi, 2019)	9
Figure 05 :	<i>Genistaferox</i> (Boudehouche 2020)	10
Figure 06 :	<i>Spartiumjunceum</i>	11
Figure 07 :	Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique ×40	13
Figure 08 :	Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse (Soussou,2013).	16
Figure 09 :	Aspect de colonies en croissance sur (YMA)	21
Figure 10 :	Cellule de Malassez	22
Figure 11 :	Effet de la température sur la croissance des souches testées	25
Figure 12 :	Effet de NaCl sur la croissance des souches testées	26

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau I :	Principales espèces connues du genre <i>Bradyrhizobium</i>	15
Tableau II:	Les souches de <i>Bradyrhizobium</i> sp. Étudiées ainsi que les souches de références	20
Tableau III :	Volume d'inoculum utilisé dans cette étude	23

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I. L'azote.....	3
I.1. Fixation biologique d'azote atmosphérique	3
I.2. Fixateurs libres.....	3
I.3. Fixateurs symbiotiques.....	4
II. Légumineuses :.....	5
II.1. Classification taxonomique.....	5
II.2. Tribu des <i>Genisteae</i>	7
II.3. Intérêt des légumineuses	11
III. Rhizobia.....	12
III.1. Définition des rhizobia.....	12
III.2. Classification des rhizobia.....	13
III. Symbiose rhizobia-légumineuses.....	15
IV.1. Langage moléculaire.....	15
IV.2. La nodulation.....	16
IV.3. Intérêt de la symbiose rhizobia-légumineuses.....	17
III. Effet des facteurs abiotiques sur la symbiose.....	17
V.1. Effet de la température.....	17
V.2. Effet du NaCl.....	18
V.3. Effet du pH.....	18
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Matériel biologique.....	20
II. Méthodes.....	20
II.1. Revivification des souches	20
II.2. Préparation des pré- culture.....	21
II.3. préparation de l'inoculum.....	21

II.3.1. Identification de la cellule Malassez.....	22
II.5. Caractérisation physiologique.....	23
III.1. Effet de la température sur la croissance.....	23
III.2. Effet du NaCl sur la croissance.....	23

Chapitre III : Résultats Et Discussion

I. Effet de la température sur la croissance des souches.....	24
II. Effet de la salinité sur la croissance des souches testées.....	25

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives	27
----------------------------------	----

Références bibliographiques

Annexe.

Résumé

Abstract

Introduction générale

Introduction

L'Algérie a une large diversité des conditions naturelle, de son relief, de sa géologie, de ses sols et de son climat, a fini par forger une grande diversité biologique. Elle a défini des biotopes variés permettant la coexistence de nombreuses espèces végétales et animales, souvent adaptées à des conditions abiotiques extrêmes ainsi qu'à de fortes pressions biotiques.

La famille des légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'Homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.

La première grande qualité des légumineuses est la capacité de production de biomasse de très haute qualité, sans nécessiter d'apport d'azote. Le second avantage est l'aptitude à fixer de l'azote, ce qui permet de soutenir leur croissance, ainsi que celle des autres plantes. L'azote est l'un des facteurs les plus limitant pour la croissance des plantes.

La plante ne fixe pas l'azote directement sans qu'elle s'associe à des bactéries rhizobiums qui ont une signification scientifique et agronomique profondes dues à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses. Cette relation est d'une importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (**Somasegaran et Hoben,1994**).

Le processus de fixation de l'azote entre les légumineuses et les bactéries rhizobium est une relation symbiotique qui est bénéfiques pour ces deux organismes, mais cette relation peut être perturbée par des facteurs abiotiques comme la température et la salinité (**Graham, 1992**).

Certains travaux ont montré que les légumineuses arbustives spontanées notamment *R. sphaerocarpa* ont un intérêt spécial dans les écosystèmes méditerranéens (**Valladares et al., 2002**). En effet ces légumineuses spontanées sont adaptées aux conditions de l'environnement extrêmes telles que la salinité, la sécheresse sévère et les hautes températures. Leurs systèmes racinaires profonds sont un atout permettant de résister au manque d'eau qu'il aspire à une profondeur pouvant atteindre 30m et par conséquent de supporter les facteurs des climats aride et semi-aride. En outre tous les projets de restauration ou de revégétalisation des sols exigent non seulement des connaissances sur les légumineuses spontanées mais aussi sur les caractères physiologiques, nutritionnelles et taxonomiques des souches utilisées afin de sélectionner les plus performantes et les plus adaptées (**Haase et al., 1996**).

Cette étude a pour but de rechercher la croissance des souches de *Bradyrhizobium* sous l'effet de différentes températures et de différents teneurs en NaCl. Les souches concernées ont été isolées à partir de nodules racinaires de plusieurs légumineuses, de différents sites géographiques et écologiques, de tribu *Genisteeae* à savoir *Retamasphaerocarpa* et *R. reatam*, *Cytisu*, *Calicotome*, *Spartium*, et *Genista* (Boulila, 2009 ; Ahnia, 2014 ; Salmi, 2018 ; Boudehouche, 2020).

Ce travail rentre dans le cadre de projet de recherche socio-économique animé par l'équipe interaction plantes-microorganismes symbiotiques du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia.

Ce document qui est fait pour soutenir un Master en Science de la Nature et de la vie, option Toxicologie industrielle et environnementale, est composé trois parties : la synthèse bibliographique qui illustre la taxonomie et la diversité des partenaires symbiotiques. Ainsi que les facteurs abiotiques influençant la symbiose. La deuxième partie comporte matériel et Méthodes où sont données les outils et les techniques utilisés. Enfin, la troisième partie comporte les résultats obtenus.

Chapitre I

Revue bibliographique

I. L'Azote

La plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume, est constituée d'azote (N₂ ou diazote) un gaz incolore et inodore (**Hopkins, 2003**).

C'est un élément essentiel pour toutes les formes de vie découvertes sur notre planète (**Hopkins, 2003**), par rapport à leur masse de matière sèche. 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. Il est donc combiné à la matière organique mais on le trouve aussi à l'état minéral sous forme de NH₄⁺, NO₃⁻ et NO₂⁻ (**Hopkins, 2003**).

L'azote favorise chez les végétaux l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (**Babo, 2002**).

L'insuffisance ou la carence de cet élément chez les plantes se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (**Tourte et al., 2005**). Les feuilles matures entrent en sénescence puisque leur azote est redirigé vers les feuilles croissantes. S'il y a excès, l'élongation des tiges est favorisée au détriment de la maturation et le développement racinaire est inhibé, pouvant mener à un approvisionnement inadéquat en eau et en éléments minéraux (**Parent, 1999**).

I.1. Fixation biologique d'azote atmosphérique

La fixation biologique d'azote atmosphérique N₂ est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Les organismes assimilateurs de N₂ sont des eubactéries et archaebactéries procaryotes réparties dans plus de 100 genres ; certaines fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose (**Pelmont, 2005**).

I.2. Fixateurs libres

On trouve des bactéries de ce type surtout dans les prairies. Elles sont en forte concentration dans la rhizosphère (**Tortora et al., 2003**). A ce groupe appartiennent des bactéries aérobies et anaérobies, ainsi que des représentants des bactéries phototrophes

(*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Chlorobium* et *Rhodomicrobium*) et des cyanobactéries, en particulier celles qui forment des hétérocystes tels que *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Colothrix*, *Rivularia* (**Richter, 1993**).

La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer de grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol, la réduction de l'azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucides disponibles (**Tortora et al., 2003**). Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique est néanmoins considérable (**Tortora et al., 2003**).

I.3. Fixateurs symbiotiques

La réduction de l'azote est très exigeante en énergie. En effet, il faut 16 molécules d'ATP (donneur d'énergie dans les cellules) pour réduire une molécule d'azote. C'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (**Dénarié, 2000**).

Les espèces fixatrices d'azote symbiotiques sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les rhizobiums, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (**Pelmont, 1995**). Les bactéries de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (**Tortora et al., 2003**).

Mais la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant des bactéries du sol, les rhizobiums aux légumineuses (**Dénarié, 2000**).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules (**Hopkins, 2003**). Les plantes concernées en profitent, en utilisant les produits de la fixation bactérienne de l'azote. En contrepartie, la plante hôte fournit aux bactéroïdes des composés carbonés, de l'énergie, ainsi que les mécanismes de protection nécessaires (**Richter, 1993**).

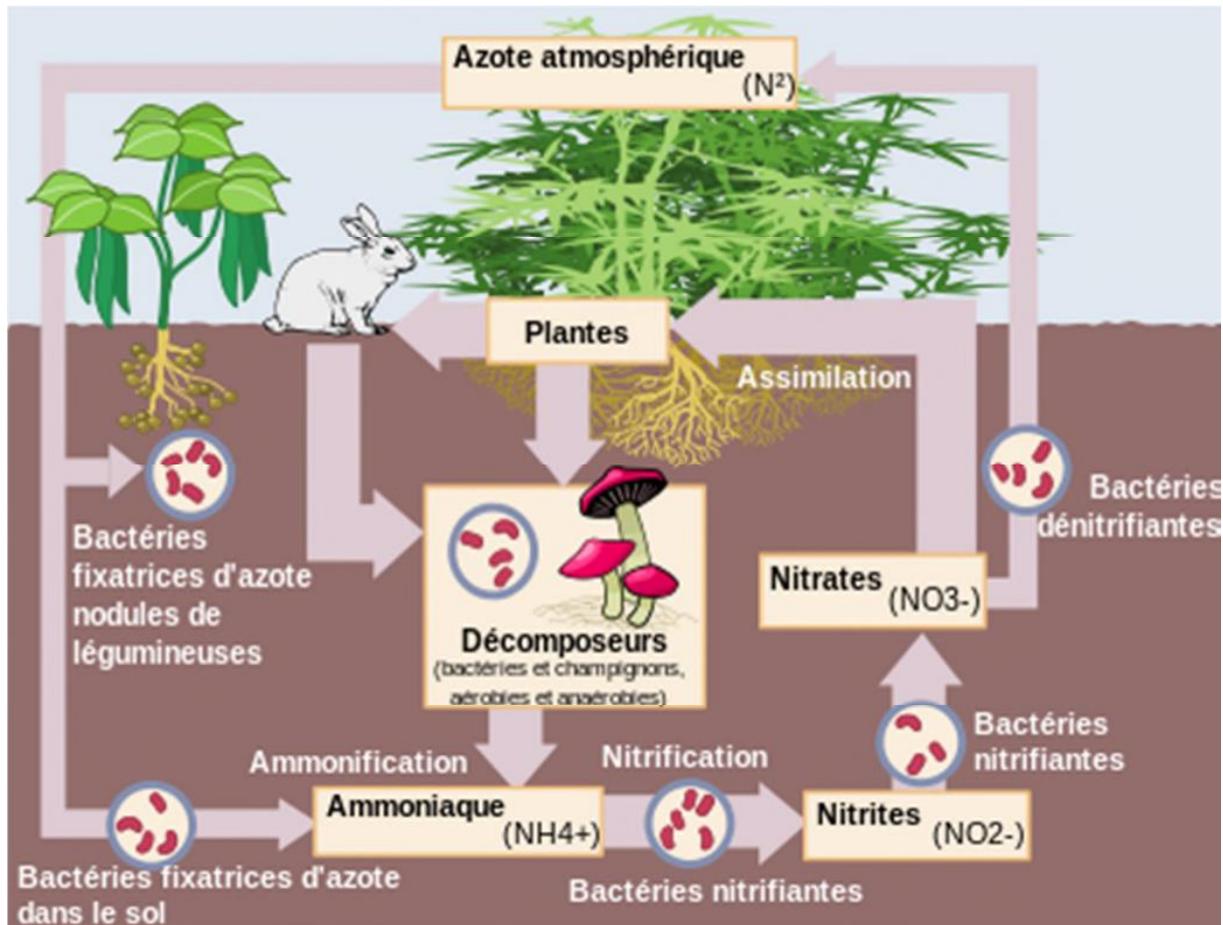


Figure 1. Cycle de l'azote

(Source : thinglink.com)

II. Légumineuses

Le bassin méditerranéen est très diversifié en plantes particulièrement en légumineuses qui constituent de loin le groupe le plus important participant à la fertilisation du sol (Sprent et al. 1987).

II.1. Classification taxonomique

D'après Quezel et Santa, (1962) la taxonomie des légumineuses est classée comme suit :

- **Domaine** : *Eucaryote*
- **Phylum** : *Plantae*
- **Sous règne des Végétaux** (phanérogame)
- **Embranchement** : Spermaphytes (plantes à graines)
- **Sous embranchement** : Angiospermes

- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous classe** : *Rosida*
- **Ordre** : *Fabales*
- **Super famille** : *Leguminosae*(*Fabaceae*)

Les légumineuses sont capables de former des associations symbiotiques avec les rhizobia(Sprent et al.1987). En terme du nombre d'espèces connues, les *Fabaceae* représentent l'une des familles de plantes à fleurs les plus importantes avec les *Orchidaceae* et les *Asterraceae*. La famille des légumineuses a une origine monophylétique qui en se basant sur les caractères morphologiques des fleurs était, traditionnellement, répartie en trois sous-familles :

➤ *Caesalpinioideae*

La plupart sont des arbres ou des arbustes tropicaux subtropicaux avec une fleur pseudo-papilionacée, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces. 23% seulement des espèces parmi celles examinées ont été connues pour leur nodulation (Maxted et Bennett.,2001).

➤ *Mimosoideae*

Elles sont caractérisées par leurs petites fleurs régulières (actinomorphe) entassées, généralement en épis ou de têtes qui ressemblent à une pom-pom(White, 2010), sous forme principalement d'arbres ou arbustes, rarement des herbes, certaines possèdent de la résine. Elles se retrouvent dans les régions tropicales, subtropicales à climat chaud. *Mimosoideae*comporte environ 60 genres et 3200 espèces, certaines sont cultivées pour la production des tannins (extrait de l'écorce) qui est utilisés dans le traitement des cuirs. Environ 10% des espèces ont été déjà examinées et la majorité ont des nodules (Benouaret et al., 2014).

➤ *Papilionoideae*

Ce sont principalement des plantes herbacées, vivaces ou annuelles et sont largement distribuées dans le monde (Räsänen, 2002).

Les *Papilionoideaes*sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisumsativum L*) et le haricot (*Phaseolusvulgaris L*) ; mais aussi pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage tels que la luzerne (*Medicagosativa L*) et le Sulla

(*Hedysarum coronarium* L) (FAO, 1996). Parmi les 21% d'espèces déjà examinées la majorité (97%) est nodulée (pois, haricot, fève, lentille...) par les rhizobia (Benouaret et al., 2014).

Papilionoideae renferme plus de 12600 espèces dans 429 genres regroupés en 31 tribus (Judd et al., 2002). Cardoso et al., (2013) ont rapporté que la tribu *Genistaeae* est l'une des plus grandes tribus des *Papilionoideae* qui a une répartition cosmopolite.

II.2. Tribu des *Genistaeae*

La tribu de *Genistaeae* (Adans) définis par (Polhill, 1976) et réarrangés par Bisby (1981), représentent une tribu diversifiée de 20 genres et environ 450 espèces. Les *Genistaeae* sont pour la plupart des arbustes qui sont distribués essentiellement en méditerrané. Elles sont écologiquement très importantes, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées qui dominent de nombreuses communautés végétales (Polhill, 1981 ; Ainouche et al., 2003).

Il existe plusieurs genres appartenant à cette tribu : genre *Retama*, genre *Cytisus*, genre *Calicotome*, genre *Genista*.etc. (Quezel et Santa, 1962).

- **Genre *Retama***

Retama est un mot qui vient de l'arabe 'retem'. Au Maghreb, il est appelé 'Rtème'. Ce genre appartenant à la sous famille *Fabaceae* et à la tribu *Genistaeae*, comprend trois espèces : *R. raetam*, *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma*. Ce sont des arbustes endémiques des régions méditerranéennes du Nord de l'Afrique (Algérie, Égypte, Maroc), du Sud de l'Espagne et du Portugal (Quezel et Santa, 1962).

En Algérie le genre *Retama* compte trois espèces : *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss (voir la figure 2), *R. raetam* Webb, et *R. monosperma* (L.) Boiss (Quezel et Santa, 1962).



Figure 2 : *Retamasphaerocarpa* (Boulila, 2009)

- **Genre *Cytisus***

Les plantes du genre *Cytisus* sont particulièrement abondantes autour de la mer Méditerranée, mais également se trouvent dans des régions géographiques 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**).

Le genre *Cytisus*, communément appelés balais, sont des arbustes ou arbrisseaux dressés de 4 à 5 pieds de hauteur, épineux ou non à floraison abondante avec des feuilles alternes. Les stipules sont réduites ou nulles. Les fleurs sont disposées en têtes et sont généralement jaunes ou blanches. D'après (**Quezel et Santa 1962**), on reconnaît à ce genre six espèces : *C. purgans*, *C. linifolius*, *C. fontanesii*, *C. monspessulanus*, *C. arboreus* et *C. villosus* (figure 3).



Figure 3 :

Cytisus villosus (Ahnia, 2015)

- **Genre *Calicotome***

Il est communément appelé le genêt épineux, ou Azezzu ou Gendoul en Algérie. Le genre *Calicotome* appartient également à la tribu des *Genisteae*, comportant essentiellement quatre espèces à savoir : *Calicotome infesta*, *Calicotome intermedia*, *Calicotome spinosa* (figure 4) et *Calicotome villosa* (Quezel et Santa, 1962).



Figure 4 : *Calicotome spinosa* (Salmi, 2019)



Figure 5 : *Genistaferox* (Boudehouche 2020)

- **Genre *Genista***

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753. Ce genre compte plus de 120 espèces. Il représente le deuxième grand genre au sein de la tribu des *Genisteae*, se multipliant quand les autres arbres disparaissent en favorisant la reconstitution du boisement (Quezel et Santa, en 1962). Ils sont très répons en Algérie où, comptent pour ce genre 23 espèces dont 11 sont endémiques (Maire, 1987). Parmi ces espèces : *Genistaferox* (figure 5), *Genistanumidica*, *Genistatricuspadata*.

Le genre *Genista* est très répons dans le bassin méditerranéen, en Europe et en Afrique du nord (Libye, Tunisie, Algérie et Maroc) en Turquie, Russie et en Caucase. En Algérie, il pousse dans la région est, sud et au grand Sahara (Quezel et Santa, en 1962) donc il est circumméditerranéen, il est constitué d'arbustes épineux et non épineux, la plupart de ces espèces forment des maquis sclérophylles (Martins et al, 2005).

- **Genre *Spartium* (genêt d'Espagne)**

Le genre *Spartium* est l'un des arbustes pérennes originaires de la région méditerranéenne, du sud de l'Europe, l'Afrique du nord-ouest. *Spartiumjunceum* est la seule espèce du genre *Spartium* de 1 à 3 mètres. Cet arbuste est non épineux, dressé à rameaux effilés cylindriques. Il produit de grandes fleurs odorantes de couleur jaune (figure 6) entre Mai et

Juillet. Les gousses sont de taille entre 6 à 8 cm sur 7 mm linéaire presque glabre, noir à la maturité comportant 12 à 18 graines (**Quezel et Santa, en 1962**).



Figure 6 : *Spartium junceum* (Boulila, 2009)

II.3. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, la phytopathologie, l'écologie et la physiologie végétale...etc.

Les légumineuses exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de rhizobium. Elles jouent par conséquent un rôle indispensable dans la rotation des cultures et assurent une agriculture "durable". Elles jouent également un rôle essentiel dans la conservation du sol, en raison de la grande quantité d'azote fixé, ce qui contribue à une agriculture durable. En effet, les résidus des légumineuses sont riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent par conséquent bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'intermédiaire des résidus laissés par les légumineuses (**Zaidi et Kaved, 2017**).

En outre, de nombreuses espèces de légumineuses cultivées constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale. En effet, elles constituent un apport de protéines important de point de vue nutritionnel (18% à 30% de la graine sèche) mais surtout peu coûteux.

En termes d'importance économique, de nombreuses espèces de légumineuse de la famille *Césalpiniacées* et de *Mimosacées* sont considérées comme une source de fourrage et de bois à usage domestique (Zaidi et Kaved, 2017). Elles sont également source d'engrais vert et produisent un grand nombre de composés comme des médicaments, des poisons, des teintures, parfums et des substances antimicrobiennes (Iskounen, 2012).

De point de vue écologique, certaines légumineuses comme celles du genre *Retama* notamment *Retama sphaerocarpa* jouent un rôle important dans la revégétalisation et la fertilisation des sols dégradés des zones arides et semi-arides grâce aux associations symbiotiques avec les rhizobia (Boulila et al., 2009).

D'autre part, les travaux de (Hammouche et al. (2017) montrent que *R. sphaerocarpa* des vertus comme plantes médicinales. En effet, les tests sur les extraits des feuilles et des graines de *R. sphaerocarpa* ont révélé une activité antibactérienne contre les souches pathogènes opportunistes de *S. aureus*.

III-Rhizobia

III.1. Définition et description des rhizobia

Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology, le rhizobium (figure 7) est une bactérie bacilles de taille 0,5-1,0 x 1,2-3,0 µm, ne formant pas de spores, Gram négatif, mobile grâce à des flagelles péritriches. (Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994).

Ces bactéries sont aérobies avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons mais peuvent bien croître en faible pression d'oxygène. En anaérobiose, elles sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons.

La température optimale de croissance se situe dans l'intervalle de 25 à 30°C. Certaines espèces peuvent, cependant croître à des températures de plus de 40°C. Le pH optimum de croissance étant de 6 à 7. Les colonies sont généralement de couleur blanchâtre ou beige, de forme circulaire, convexe, translucides ou opaques, mucilagineuses et bombées. La croissance des rhizobia est possible sur milieu contenant du mannitol et de l'extrait de levure (YMA) (Somasegaran et Hoben, 1994).

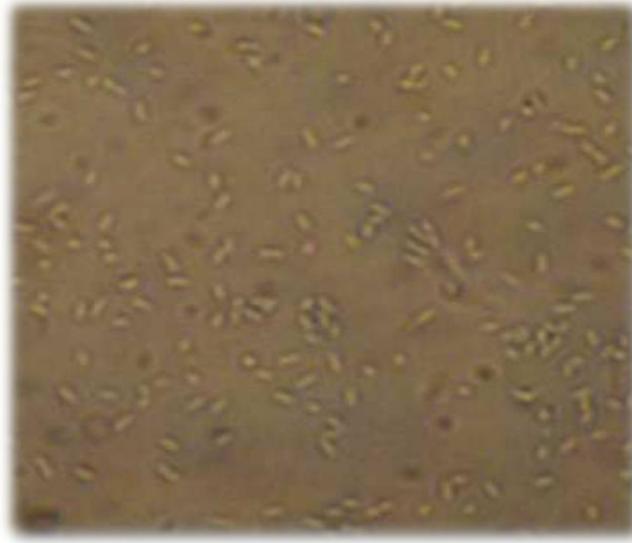


Figure 7 : Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique $\times 40$ (Boulila, 2009)

III.2. Classification des rhizobia

La classification des rhizobiums, à l'image de la taxonomie bactérienne, est basée sur une approche polyphasique qui ne retient plus les propriétés symbiotiques comme critère taxonomique. En effet, approche polyphasique se base sur la caractérisation phénotypique et une caractérisation génotypique et une caractérisation phylogénétique.

Les travaux de **Boivin et al., (1998)** montrent qu'une même légumineuse peut être nodulée par différentes espèces de rhizobiums ex : le soja est nodulé par *Sinorhizobium fredii* et *Bradyrhizobium japonicum* tandis qu'une même espèce peut regrouper des bactéries de spécificités d'hôte différentes exemple de *Rhizobium leguminosarum* est divisé en trois biovars bv. viciae, bv. trifolii et bv. phaseoli).

Les méthodes d'énumération des rhizobia et la mesure de la diversité n'ont pas donné une description exacte ; le nombre peut être sous-estimé et la diversité pourrait aussi être masquée grâce aux divergences causées par le choix de la plante hôte et les facteurs du sol (**Terefework, 2002**). Ainsi les rhizobia appartiennent à la classe des α -et des β -Protéobactéries

:

Les rhizobia de la classe α -Protéobactéries appartiennent à l'ordre des *Rhizobiales* et se répartissent en 11 genres à savoir : *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*).

Alors que les rhizobia de la classe β -Protéobactéries appartiennent à l'ordre des *Burkholderiales* et se répartissent en deux genres, *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Peix et al., 2015). Cette classification est loin d'être définitive (Weir, 2016), car on estime que seulement près d'un tiers des légumineuses a été étudié pour leur aptitude à noduler.

La découverte de nouvelles techniques taxonomiques a permis de reclasser les espèces des rhizobia dans de nouveaux genres. La récente classification est publiée sur le site : www.bacterio.net.

- **Genre *Bradyrhizobium***

Bradyrhizobium est un genre qui a été décrit pour la première fois par Jordan en 1984. Il comporte des rhizobia à croissance lente. Ainsi, le préfixe Brady signifie lent. *Bradyrhizobium* est un genre comportant plusieurs espèces dans la famille des *Bradyrhizobiaceae*. Il est caractérisé par un grand génome, avec un chromosome d'environ 8 Mb. *Bradyrhizobium japonicum* est la première espèce décrite par ce même auteur Jordan (1984). D'autres espèces ont été décrites par la suite telles que *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *B. valantinum* (Durán et al., 2014). Le (tableau I) montre les principales espèces de *Bradyrhizobium* connues jusqu'à aujourd'hui.

En Algérie et au laboratoire d'écologie microbienne, l'équipe interaction plante microorganismes a décrit plusieurs *Bradyrhizobium* sp. Isolés à partir de nodules racinaires des légumineuses de tribu *Genisteeae* notamment *Retamasphaeocarpa* et *Retamareatam* (Boulila et al., 2009), *Cytisus villosus* (Ahnia et al., 2014), *Calicotome* (2018), *Gensita* (2020). Récemment, cette même équipe a décrit *Bradyrhizobium algeriense* (Ahnia et al., 2018) qui est une espèce isolée à partir de *Retamasphaerocarpa* de Toudja (Béjaia). Ces auteurs indiquent que *B. algeriense* peut noduler plusieurs légumineuses de tribu *Genisteeae* (*Cytisus villosus*, *Genistanumidica*, *G. ferox*, *G. tricuspidata*, *Calicotome*, *Spartium*, ... etc. Ce qui est un atout pour les projets de revégétalisation des sols dégradés ou pauvres en Algérie.

Tableau I : principales espèces connues du genre *Bradyrhizobium*

<i>Genres & espèces</i>	<i>Plante hôte</i>	<i>Référence</i>
<i>B.japonicum</i>	<i>Glycine max, Genistasp.</i>	<i>Jordan, 1984</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Chamaecytisus,</i>	<i>Vinuesa et al, 2005</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Lupines</i>	<i>Kuy kendall et al, 1992</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Xu et al, 1995</i>
<i>B.algeriense</i>	<i>Retamasphaerocarpa</i>	<i>Ahnia et al, 2018</i>

IV-Symbiose rhizobia-légumineuse

Le processus d'une symbiose fixatrice d'azote se traduit par la capacité des rhizobia à induire la formation de nodosités au niveau des racines ou des tiges d'une plante hôte particulière. A l'intérieur du nodule la bactérie intracellulaire se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en ammoniac (**Lerouge et al., 1990**).

IV-1. Langage moléculaire

La symbiose rhizobia-légumineuses est basée sur des interactions moléculaires complexes, qui contrôlent le processus de symbiose (**Lansing et al., 2003**) entre des deux partenaires rhizobia- légumineuses avec un haut niveau de spécificité d'hôte. En effet, cette spécificité est basée sur un dialogue moléculaire, qu'est un échange de signaux entre les partenaires symbiotiques. (**Lerouge et al., 1990 ; Bergum et al., 2001**).

Les travaux de **Lansing et al., 2003** ont montré que l'infection par rhizobia est contrôlée par le gène **bacA** qui est nécessaire à l'établissement du nodule.

D'autres travaux indiquent que les rhizobia répondent à des signaux tels que les flavonoïdes excrétés par la racine de la plante hôte, vont induire en retour l'expression des gènes de la Finodulation(**Gènenod**) (**Lerouge et al., 1990, Bergum et al., 2001**).

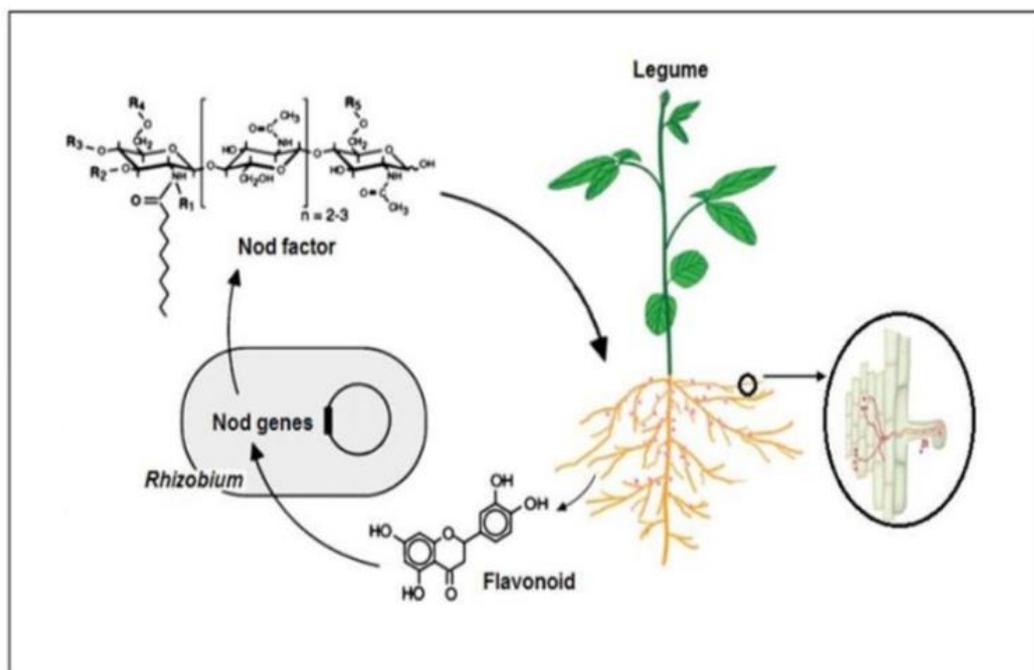


Figure 8 : Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse (Soussou, 2013).

IV- 2. Nodulation

Les légumineuses forment une endosymbiose avec des bactéries fixatrices d'azote une endosymbiose avec des bactéries fixatrices appelées rhizobia dans un processus de développement soigneusement orchestré appelé nodulation (Guan *et al.*, 2013).

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de ces associations qui sont strictement contrôlées par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Dhane Fitouri, 2011 ; Khan *et al.*, 2010). Lorsque la nodulation a lieu, le nombre de nodosités mis en place au sein du système racinaire de la légumineuse est proportionnel aux besoins en azote de la plante pour sa croissance (Voisin, 2015).

Sur la base de leur morphologie, leur structure et la durée du fonctionnement du méristème nodulaire, les nodules des légumineuses se subdivisent en deux catégories :

➤ **Les nodules indéterminés :** Les nodules de type Indéterminé sont formés par les légumineuses issues de milieux tempérés comme la luzerne, le pois ou le trèfle.

Ces nodules se développent à partir des cellules du cortex interne (Vernié, 2008). Il a un méristème apical persistant et adopte une forme cylindrique (Coba *et al.*, 2018)

➤ **Les nodules déterminés** : Les nodules de ce type sont formés par des légumineuses d'origine tropicale comme le soja ou le haricot. Ces nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe et sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant (Vernié,2008). Il a un méristème latéral qui reste actif pendant quelques jours. Après l'arrêt de l'activité méristématique, le nodule se développe par expansion cellulaire et adopte une forme sphérique (Coba et al., 2018).

IV-3. Intérêt de la symbiose rhizobia-légumineuse

Dans des régions où les sols sont généralement pauvres en azote, la fixation symbiotique de l'azote est devenue un élément incontournable des politiques de limitation des apports d'engrais azotés que ce soit pour des raisons économiques, écologiques ou de durabilité de l'activité agricole (Alkama et al.,2002 ; Jeder et al., 2003). En effet les légumineuses cultivées en association avec leurs symbiotes fixent 40 à 60 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996).

V-Effet des facteurs abiotiques sur la symbiose

La survie des rhizobia dans le sol, la formation des nodosités et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensible à l'action directe d'un certain nombre de facteurs de l'environnement (Guy, 1987). En effet, plusieurs facteurs peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice de l'azote après symbiose (Collavino et al., 2005 ; Kinkema et al.,2006).

V-1. Effet de la température

La température a un effet sur la symbiose et intervient dans le processus d'infection des poils racinaires, la différenciation de la bactérie au sein du nodule, la structure et le fonctionnement nodulaire (Domergue, 2006).

Elle peut également avoir un impact sur la persistance des rhizobia dans l'inoculum durant son stockage, leur survie dans le sol ainsi que sur la nodulation et la fixation d'azote (Graham, 1992).

Il a été rapporté, que les rhizobia sont tolérantes aux basses températures de l'ordre de 4°C et 5°C. C'est le cas courant chez des rhizobia isolées des régions arctiques (Bordeleau and

Prévost, 1994). D'autres travaux ont montré que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes nod et donc l'infection et la nodulation. A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité. La température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce (Zahran, 1999).

V-2. Effet du NaCl

La tolérance des rhizobia à la salinité est plus ou moins variable où certaines souches sont inhibées en culture pure à des concentrations en sel de 100 Mm alors que d'autres tolèrent des concentrations supérieures à 400mM (**Domergue, 2006**). Cependant, il est admis généralement que la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote, au moins en partie, en limitant le fonctionnement des nodosités par une baisse de leur conductance à la diffusion de l'oxygène. En plus, dans les régions arides et semi-arides, la salinité est un facteur majeur de la détérioration du sol qui devient non utilisable pour l'agriculture (**Saadallah, et al., 2001**).

Les cellules de rhizobia exposées aux concentrations élevées de sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés) et le glutamate ou des carbohydrates comme le saccharose afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (**Domergue, 2006**).

V-3. Effet du pH

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace dans le sol (**Bordeleau et Prévost, 1994**).

Il a été rapporté que l'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobia et engendre par conséquent une diminution de la nodulation. Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (**Dhane Fitouri, 2011**).

La croissance de rhizobia et de la plante hôte est limitée sur les pH extrêmes. La majorité des légumineuses requièrent un pH du sol neutre ou légèrement acide pour leur croissance

spécifique lorsqu'elle dépend de la fixation symbiotique d'azote (Zahran, 1999). Cependant, Les travaux d'El-Hilali, (2006) indiquent que l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9.

Chapitre II

Matériel et méthodes

Dans cette étude, nous avons recherché l'effet de la température et la salinité sur la croissance de *Bradyrhizobium* sp. isolés de nodules racinaires de quelques légumineuses appartenant à la tribu *Genisteeae*. Ce travail est effectué au sien de laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia.

I. Matériel biologique

L'étude a porté sur six (06) souches de *Bradyrhizobium* sp. Appartenant à la collection du laboratoire d'écologie Microbienne de l'université de Béjaia. Le (tableau II) montre les légumineuses à partir desquelles ces souches ont été isolées.

A titre de comparaison, nous avons pris deux souches de référence appartenant au même genre. Il s'agit de la souche type de *Bradyrhizobium algeriense* RST89_T et de la souche type PAC68T de *Bradyrhizobium jicamae*. Ces deux souches de référence appartiennent au même genre que les souches étudiées. En outre, RST89 a été isolée à partir de *Retama sphaeocarpa*. Ce qui justifié le choix de ces deux souches de référence.

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

Souches	Plante hôte	Références
<i>B. algeriense</i> RST89 _T	<i>Retama sphaerocarpa</i>	Ahnia et al.,2018
<i>B. jicamae</i> PAC68T	<i>Pachyrizuserosus</i>	Ramirez et al., 2009
Ca ₅₉	<i>Calicotone spinosa</i>	Salmi et al.,2018
RSA ₁₀₄	<i>Retama retam</i>	Boulila et al.,2009
SSET ₁₆	<i>Retama retam</i>	Boulila et al.,2009
GT ₂₉	<i>Genistatricuspudata</i>	Boudehouche et al.,2020
SPA ₂₄	<i>Spartium junceum</i>	En cours d'étude
CTO ₁₀	<i>Cytisus villosus</i>	Ahnia et al., 2014

II-Méthodes

II-1. Revivification des souches

Les six souches concernées par cette étude ainsi que les souches de référence qui étaient conservées au congélateur -80°C ont été cultivées sur boîte Pétri contenant le milieu de culture

solide (YMA) composé de mannitol et de l'extrait de levure (voir l'annexe 01). Ces souches ont été incubées à 28°C pendant 8 jours afin de les revivifier et activer leur métabolisme.

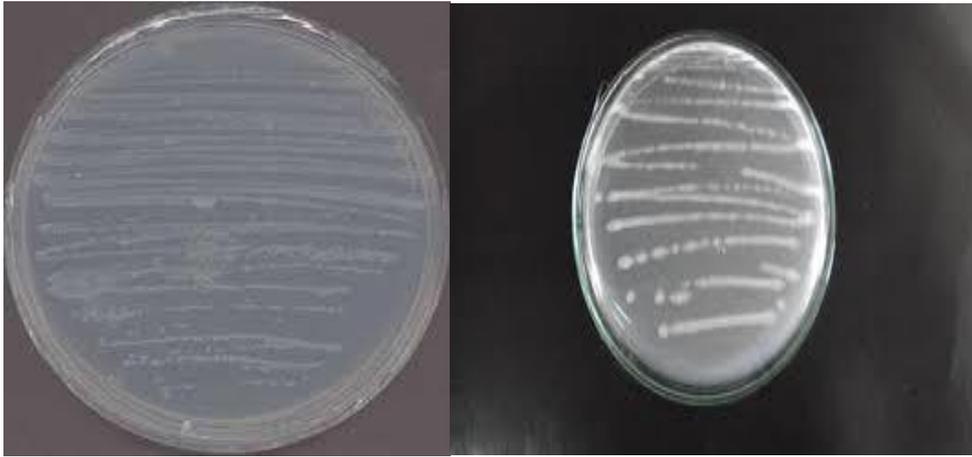


Figure 09 : Aspect de colonies en croissance sur YMA.

II-2. Préparation de Pré-culture

Après avoir activé et revivifié la croissance des souches étudiées nous avons pris une colonie de chaque souche étudiée pour l'ensemencer dans un tube à essai contenant 5 ml de milieu de culture liquide YMB (annexe 01).

L'incubation a été effectuée à 28°C pendant 7 jours pour les six cultures ainsi que les deux souches de références. Après cette période ces cultures sont ensemencées dans des flacons contenant 100 ml du milieu YMB. Cette série d'ensemencement et d'incubation permet de préparer la pré-culture.

II-3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum choisi pour notre étude est 10^7 cellules par millilitre. Ainsi, pour préparer cet inoculum pour les souches de *Bradyrhizobium*sp. étudiés ainsi que les deux souches de référence, nous avons utilisé la cellule de Malassez (figure 10) qui comporte 100 rectangles d'égales surfaces.

Entre la cellule de Malassez et la lamelle, on dépose une suspension bactérienne puis on dénombre les bactéries par rectangle et on ramène le résultat obtenu par litre de liquide.

II-3.1. Identification de la cellule Malassez

C'est une lame quadrillée dont la superficie est de 1 mm cube, donc lors d'un comptage des cellules sur cette cellule le résultat obtenu exprimé en nombre d'éléments / mm cube.

Elle est faite de 10 carreaux à l'horizontale sur 10 carreaux verticaux, chaque série de 10 carreaux horizontaux est appelé une bande, elle contient donc 10 bandes horizontales et vise versa à la verticale.

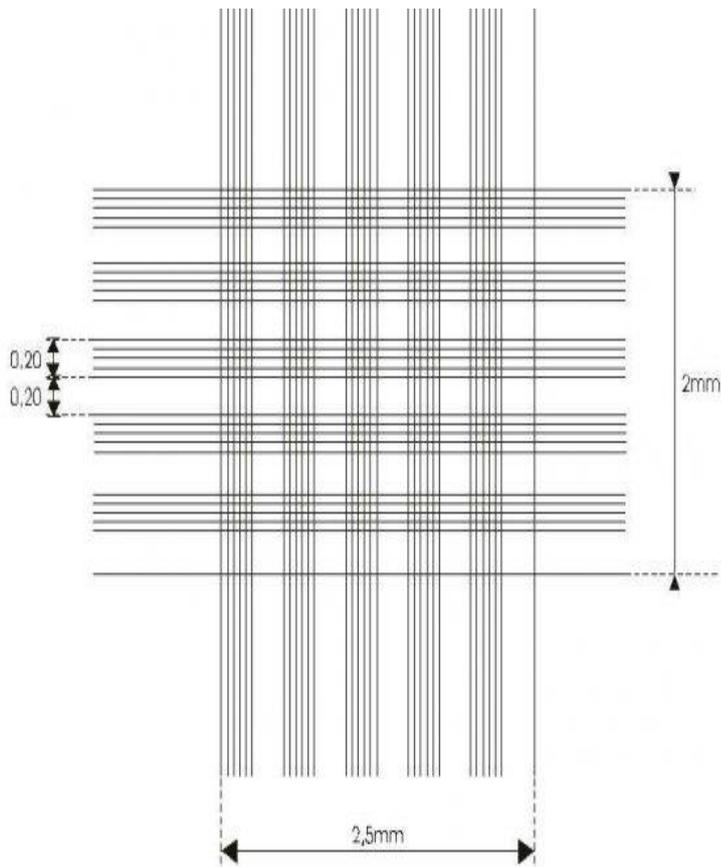


Figure 10 : Cellule Malassez

II-4. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié, l'influence de facteurs abiotiques tels que la température et le NaCl sur la croissance des six souches et les souches de référence. Pour chaque expérience une culture cellulaire contenant environ 10^7 cellules/ml a été utilisée. Le dénombrement par cellule de Malassez nous a permis de calculer les volumes nécessaires à inoculer pour avoir le même inoculum de départ (**Tableau III**).

Après inoculation et incubation pendant 8 jours, la croissance des souches a été estimée par l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda=630$ nm. Trois exemplaires ont été pris en considération pour chaque test.

Tableau III : Volume d'inoculum utilisé dans cette étude

Souches	Volume (ul)
<i>B.algeriense</i>	160
<i>B.iecamea</i>	140
Ca ₅₉	130
RSA ₁₀₄	150
SSET ₁₆	135
GT ₂₉	145
SPA ₂₄	160
CTO ₁₀	145

III -1. Effet de la température sur la croissance

L'effet de la température sur la croissance des souches de *Bradyrhizobium* sp. ainsi que les souches de référence a été étudié sur milieu YMB réparti dans des tubes à essai à raison de 5 ml. Chaque tube a étéensemencé avec une suspension bactérienne de pré-culture. La gamme des températures choisie est comme suit : 26, 28, 30, 32, 34 et 36°C.

III -2. Effet du NaCl sur la croissance

L'effet du NaCl sur la croissance des souches a été réalisé dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu YMB. La gamme du NaCl testé est comme suit 100mM, 200mM, 300mM et 400Mm.

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Effet de la température sur la croissance des souches

L'effet de la température sur la croissance des souches, isolées de *Genisteeae* ainsi que les souches de référence, sont illustrées dans la figure 12. Ces résultats montrent un comportement variable vis-à-vis de la température. En effet, la plupart des souches y compris des souches de référence poussent entre 26 °C et 34 °C. L'optimum de croissance des souches se situe entre 28 °C et 30 °C pour toutes les souches isolées de nodules racinaires de légumineuse appartenant au tribu *Genisteeae*. En effet, les souches isolées de *Retama* SSET16, RSA104 ainsi que la souche type *Bradyrhizobiumalgeriense* RST89 ont un optimum de croissance à 28°C et les souches isolées de *Genistatricuspdata* GT29, de *Spartium* SPA24, de *Cytisus* CTO10 et de *Calicotome* Ca59 ont un optimum de croissance à 30°C. Il est à signaler que la souche type *Bradyrhizobiumjicamae*, n'appartenant pas à la tribu *Genisteeae*, a un optimum de croissance à 32°C.

Il a été observé qu'à l'exception de SSET₁₆ qui est très sensible à la température de 36°C toutes les souches tolèrent cette température. En effet, la souche *Bradyrhizobiumalgeriense*, nodulant *Retamasphaeocarpa*, est la plus tolérante à la température de 36°C suivit GT29 et de CTO10. La tolérance des souches à des températures élevées est un atout considérable pour les projets de revégétalisation des sols dégradés des zones arides et semi-arides (**Boulila, 2009**).

Les résultats obtenus concordent avec ceux rapportés par **Boulila, (2009)**; **Ahnia, (2015)**, **Salmi (2019)** et **Boudehouche (2020)** qui indiquent que la gamme optimale de croissance des *Bradyrhizobium* sp. isolés des *Genisteeae* se situe entre 28°C et 30°C. En outre, Le caractère mésophile des rhizobia a été déjà signalé dans les travaux de **Graham (1992)** et **Zahran (1999)** qui ont montré que les rhizobia ont un optimum de croissance entre 28°C et 32°C et beaucoup ne peuvent pas se développer à 37°C.

Beaucoup de rhizobia ne se développent pas à des températures plus élevées (37°C), **Cloutier et al (1992)** a expliqué que cela est dû à la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Concernant les températures basses, une gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation des enzymes des bactéries peut se produire. Et dans le cas d'adaptation de ces bactéries au choc thermique pourrait s'expliquer par l'expression des protéines de stress thermique HSP (Heat Shock Proteins) HSP **Cloutier et al (1992)**. Nous pensons que la souche type, isolée de *Retamasphaerocarpa*, *Bradyrhizobiumalgeriense* RST89

est la seule à réagir positivement au stress thermique à 36°C. En effet, à partir de 32°C sa croissance diminue ensuite reprend à 36°C. Ce qui pourrait s'expliquer par une adaptation à cette température élevée. Ceci serait un ajout également pour les projets de revégétalisation en Algérie dans les sols pauvres et ou dégradés des régions arides et semi-arides.

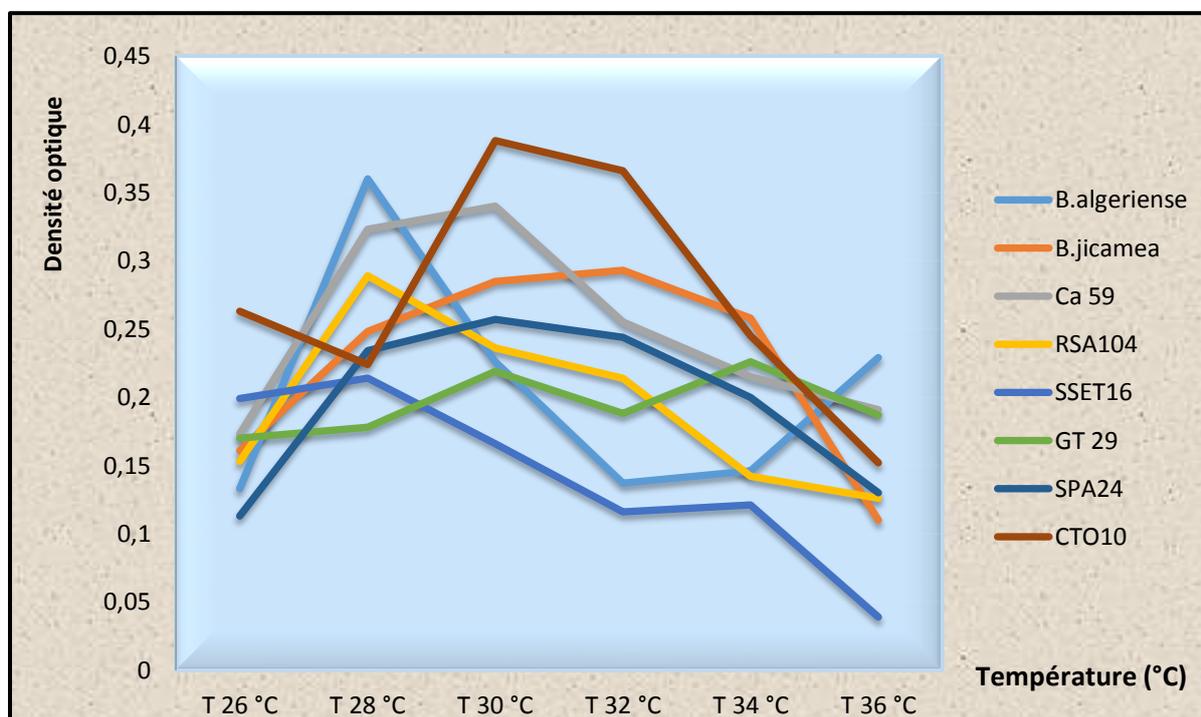


Figure 11 : Effet de la température sur la croissance des souches testées.

II.Effet du NaCl sur la croissance des souches étudiées

Après incubation des souches isolées de *Genistea* ainsi que les souches de référence pendant 08 jours à 28 °C, nous avons obtenu les résultats illustrés dans la (**figure 12**). Ces résultats montrent que la croissance de la plupart des souches est affectée par la concentration du NaCl à l'exception de la souche Ca59 qui tolère même une concentration de 400mM.

Concernant les souches GT29, CTO10 et SSET16, malgré leur sensibilité au NaCl, elles continuent de croître entre 200 et 400 mM. Avec la Ca 59, elles pourraient avoir un intérêt certains dans les projets de revégétalisation des sols salins.

La souche type *B.jicamea* présente le même comportement que la souche type *B.algeriense*. En effet les deux espèces sont affectées par la salinité. La souche SPA24 semble la plus sensible à la salinité par rapport aux autres choses.

Cette sensibilité au NaCl, des souches de *Bradyrhizobium* isolées des *Genistea* été déjà rapporté par plusieurs auteurs (Boulila, 2009 ; Ahnia, 2015, Salmi, 2019 et Boudehouche 2020).

Cependant, le caractère halophile a été également signalé chez les isolats d'*Acacia*, de *Prosopis* et de *Leucaena* qui tolèrent 500 à 850mM de NaCl (Tilak *et al.*, 2005). Ce stress salin est une contrainte qui provoque la synthèse des exopolysaccharides des rhizobies qui sont utiles dans l'adaptation. En outre, d'autres rhizobies s'adaptent aux stress salin par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes ou osmoprotecteurs (Zahran, 1999).

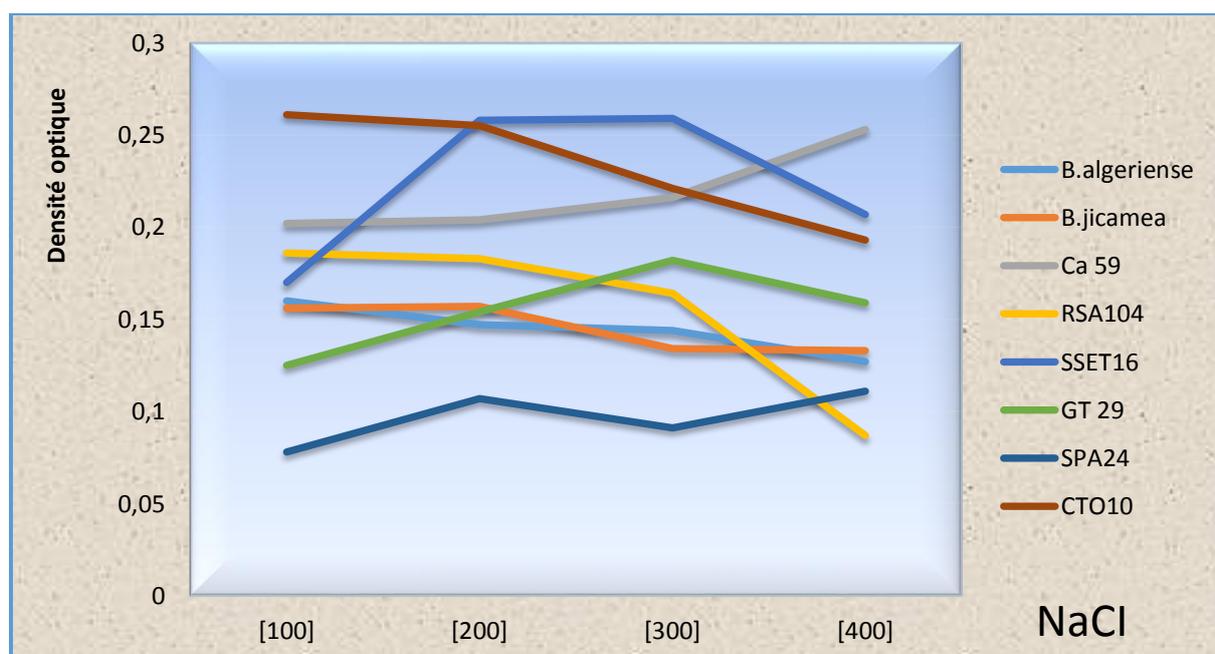


Figure 12 : Effet du NaCl sur la croissance des souches testées.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons recherché l'effet de la température et du NaCl sur la croissance de plusieurs souches isolées de nodules racinaires de *Retama*, *Spartium*, *Calicotome*, *Genista*, *Cytisus* appartenant à la tribu de *Genisteeae*. Deux souches de référence ont été prises à titre de comparaison.

L'ensemble des résultats montre que la plupart des souches y compris des souches de référence poussent entre 26 °C et 34 °C. Il est à signaler que la souche type *Bradyrhizobiumjicamaea*, n'appartenant pas à la tribu *Genisteeae*, a un optimum de croissance à 32°C.

L'espèce *Bradyrhizobiumalgeriense*RST89 semble la seule à réagir positivement au stress thermique de 36°C. Ceci pourrait être intéressant pour la restauration des sols pauvres et ou dégradés des régions arides et semi-arides.

Concernant l'effet du NaCl sur la croissance des souches étudiées, la plupart des souches nodulant *Genisteeae* étudiées sont affectée par NaCl à l'exception de la souche Ca59 qui tolère même une concentration de 400mM. En outre la sensibilité de certaines souches au NaCl, elles continuent de pousser entre 200 et 400 mM. C'est le cas des souches GT29, CTO10 et SSET16. Avec la Ca59, elles pourraient avoir un intérêt certains dans les projets de revégétalisation des sols salins.

En perspective, il serait intéressant :

- D'élargir cette étude physiologique sur d'autres facteurs abiotiques tels que le pH, les métaux lourds et les pesticides.
- Elargir cette étude afin de sélectionner des souches performantes nodulant les *Genisteeae* intéressante pour la restauration des sols dégradés et ou pauvre des régions arides et semi arides.
- De tester ces facteurs abiotiques sur le couple symbiotique *Bradyrhizobium*-plante hôte afin de sélectionner le couple symbiotique le plus performant pour les projets de revégétalisation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

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

◆ Ahnia H. (2015). Caractérisation phénotypique des endosymbiontes de *Cytisuss p.* Thèse de Magister. Filière Science de la Nature. Université A. MIRA de Béjaia. 81 p

◆ Alkama et al., 2002 ; Jeder et al., 2003 Alkama N., Noureddine N.E., Haddadj A., Sadji H., Issad S., Amrani S., 2002. Lapratique de l'inoculation en agriculture et en foresterie : une biotechnologie à notre portée communication orale présentée au 2eme congrès de Biotechnologie. Tunisie.

B

◆ 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.

◆ Boivin, C., Giraud, E., L.R., Malpica, C.A., and Rosenberg, C, (1998). Genetic analysis of a region of the Rhizobium meliloti Symplasmid 34 specifying catabolism of trgonelline, a secondary metabolite presente in legumes. Journal of Bacteriology. 173(9): 2809-2817

◆ Bordeleau et Prévost, 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant Soil. 161p.

◆ Boudehouche, W. (2020). Caractérisation polyphasique des endosymbiotes isolés de Genistasp. Thèse de Doctorat LMD en Sciences Biologiques. Université A. MIRA de Béjaia, 253 p.

◆ Boulila, F. (2009). Caractérisation phénotypique et génotypique des rhizobia isolés de *Retama* ». Thèse de doctorat en Sciences. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, UA. MIRA Bejaia. 87p

◆ **Boulila, F., et G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G. Depret.** «*Retama* species growing in different ecological-climatic areas of Northeastern Algeria. » (Syst. Appl. Microbiol.), n° 32, 245–255 (2009).

C

◆ **Cloutier, E., Guay, J. H., Latouche, D. (1992)** **Le virage** : l'évolution de l'opinion publique au Québec depuis 1960 ou comment le Québec est devenu souverainiste. Montréal : Québec/Amérique.

◆ **Coba De Le Pena T., Fedorova E., Pueyo J.J., Lucas M.M., 2018.** *Frontiers in PlantScience*.

◆ **Collavino M., Riccillo P M., Grasso D H., Crespi M., Aguilar OM., 2005.Kinkema M., Scott P T., Gresshoff M., 2006.** GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the Sino rhizobium meliloti-Alfalfa symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18.pp.742-750. Legume nodulation: successful symbioses through short and long distance signaling. *Func. Plant Biol.* 33. pp.707-721.

D

◆ **Davet P. (1996).** *Vie microbienne du sol et production végétale.* Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA. Paris.

◆ **Dénarié, 2000.** Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisés le 8 janvier 2000 ...

◆ **DhaneFitouri, 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.

F

◆ **FAO, 1996.** Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO.

◆ **F. Valladares, P. Villar-Salvador, S. Dominguez, M. Fernandez-Pascual, J.L. Penuelas, F. I. Pugnaire.** Enhancing the early performance of the leguminous shrub

Retamasphaerocarpa (L) Boiss.: fertilization versus Rhizobium inoculation. Plant and Soil. 240(2002) 253-262.

G

- ◆ **Guan D., Stacey N., Liu C., Wen J., Mysore K.S., Jerez I.T., Vernié T., Tadege M., Zhou C., Wang Z., Udvardi M.K., Oldroyd G.E.D., and Murray J.D., 2013.** Rhizobial Infection Is Associated with the Development of Peripheral Vasculature in Nodules of *Medicago truncatula*. Plant Physiology. 162 (1): 107–115 et al., 2013
- ◆ **Graham, J., 1992.** Salt tolerance of plants. Science Progress. 76: 273-285
- ◆ **Graham P. H. (1992).** Stress tolerance in Rhizobium and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Canadian Journal of Microbiology. 38 (6), 475-484.
- ◆ **Graham, P.H., 2008.** Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth M.J., James E.K., Sprent J., L., Newton W.E. (Eds): Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Springer, p23-43.

H

- ◆ **Hammouche-Mokrane Nawal, Leon-Gonzalez Antonio J., Navarro Inmaculada, Boulila Farida, Benallaoua Said and Martin-Cordero Carmen.** Phytochemical Profile and Antibacterial Activity of *Retamaraetam* and *R. sphaerocarpa* stems from Algeria. Natural Product Communications. 2017. Vol. 12, No. 12 : 1857 – 1860.
- ◆ **Hopkins, W.G., 2003 :** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119.

J

- ◆ **Jordan D. 1984.** Family III. *Rhizobiaceae*, p. 234-242. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md.
- ◆ **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.

L

- ◆ **Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C. et Denarié, J. 1990-**Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature, 344 (6268) : 781-784.

M

- ◆ **Madigan M., Martink J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Edition Person Education France. p. 599-601, 676-681.
- ◆ **Maire. R., (1987)** ENCYCLOPEDIE BIOLOGIQUE, flore de l'Afrique du nord, edition chevaliers paris. Vol XVI, 301p.

P

- ◆ **Parent L.E., (1999)** Fertilisation azotée et utilisation de tests rapides de dosage des nitrates dans la production brocoli. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.), Université Laval, Québec In : Villeneuve.
- ◆ **P. Haase, Francisco I. Pugnaire, Eva Maria Fernfindez, Juan Puigdeffibregas, S.C. Clark, L.D.Incoll,** An investigation of rooting depth of the semiarid shrub *Retamasphaerocarpa* (L.) Boiss. by labelling of ground water with a chemical tracer. Journal of Hydrology. 177 (1996) 23-31.
- ◆ **PelmontJ.,1995.** Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. Vol 2. Pp 541-572.
- ◆ **Pelmont J., 2005.** Biodégradation et métabolisme. EDP Science.
- ◆ **Polhill, R. M.** «*Genisteeae* (Adans.) Bentham and related tribes (Leguminosae). » (Bot. Syst.), n° 1 : 143-368. (1976).

Q

- ◆ **Quezel, P., et S. Santa.** « Nouvelle Flore d'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales. » (2 Tomes, Editions CNRS,) (1962-1963).

R

- ◆ **Räsänen, L. (2002).** Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* these de doctorat de l'université de Hlsinki. Finlan.
- ◆ **Richter, L 1993.** Reclassification of America *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseol type Istrains as *Rhizobium etli* sp

S

- ◆ **Saadallah K., Drevon J.J., Abdelly C., 2001.** Nodulation et croissance nodulaire chez le Haricot (*Phaseolusvulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21: 627–634.

- ◆ **Salmi, A., F. Boulila, Y. Bourebaba, C. Le Roux, D. Belhadi, et P. De Lajudie.** «Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Calicotomespinosa* in the Northeast of Algeria. » (Syst. Appl. Microbiol.), n° 41, 452–459, (2018).
- ◆ **Salmi, A. (2019)** Caractérisation phénotypique, génotypique et phylogénétique des rhizobia nodulant *Calycotomespinosa*. Thèse de Doctorat en Sciences. Université A. MIRA de Béjaia, 105 p.
- ◆ **Somasegaran et Hoben (1994)**, Handbook for Rhizobia. Sringerverlage New York
- ◆ **Soussou, 2013** Adaptation de la symbiose Fabacées-Rhizobium aux sites miniers : absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse de doctorat, université de Sousse, pp.52-84.
- ◆ **Sprent R., Sutherland J.M. & S.M. de Faria. (1987)**. Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 317, 1111-29. Systematic Applied Microbiology 36:218–223
- ◆ **Sprent, J.I., 2001**. Nodulation in legumes. Dickerson (Eds). Royal botanical garden. Kew. United Kingdom. 364p.

T

- ◆ **Terefework Z., 2002** Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN.
- ◆ **Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Shilpi Mittal, Tripathi A. K. & Johri B. N. (2005)**. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current Science. 89 (1), 136-150.
- ◆ **Tortora, G.J., Funk, B.R. et Case, C.L. (2003)**. Introduction à la microbiologie. Eddition du Renouveau Pédagogique Inc. 945 p.
- ◆ **Tourte Y., Bordonean M., Henry M. (2005)**. Le monde des végétales organisations, physiologie et génomique. Ed. DUNOD. Paris. France.

V

- ◆ **Vernié T., 2008**. Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Médicago Truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat, université Toulouse III-paul Sabatier, Toulouse .263p.

♦ **Vinuesa.P, Milagro. L, Silva. C, Willems.A, Jarabo-lorenzo.A, Perez.R, Dietrich Wener and Espernza M. R** : *Bradyrhizobium canariense* nov ., and acid tolerant endosymbiont that nodulated endemic genistoid legume (*Papilionoideae* : *Genisteae* from the canary is lands along with *Bradyrhizobium Jopanicum* bv. *genitearum*, *Bradyrhizobium-species alpha* and *Bradyrhizobium genospecies beta*. International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology (55) (2005). 569-575.

W

♦ **White, R. (2010)**. International Legume Database & Information Service

X

♦ **Xu. L. M, Ge. C, Cui.Z., Li. J, and Fan. H**: 1995.*Bradyrhizobium liaoningense* sp.nov. isolated from the root nodules of soybeans. Int. J.Syst. Bacteriol.45 (1995) 706-711.

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

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de cultures (Vincent, 1970).

Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol10 g
Extrait de levure.....	.0 ,4g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0 ,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2g
NaCl.....	0 ,1g
Agar	15 g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0 ,4g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0 ,5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,2g
NaCl.....	0.1 g
Eau distillé.....	1 l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20 min.

Annexe II : Effet de la température

	T°26	T°28	T°30	T°32	T°34	T°36
<i>B.algeriense</i>	0.133	0.364	0.226	0.137	0.146	0.229
<i>B.jicamea</i>	0.161	0.248	0.285	0.293	0.258	0.110
Ca ₅₉	0.173	0.323	0.340	0.255	0.215	0.191
RSA ₁₀₄	0.153	0.289	0.236	0.214	0.142	0.126
SSET ₁₆	0.199	0.214	0.166	0.166	0.121	0.039
GT ₂₉	0.170	0.178	0.219	0.188	0.226	0.187
SPA ₂₄	0.113	0.234	0.257	0.244	0.200	0.130
CTO ₁₀	0.263	0.224	0.388	0.366	0.245	0.152

Annexe III : Effet de NaCl

	[100]	[200]	[300]	[400]
<i>B.algeriense</i>	0.160	0.147	0.144	0.127
<i>B.jicamea</i>	0.156	0.157	0.134	0.133
Ca ₅₉	0.202	0.204	0.216	0.253
RSA ₁₀₄	0.186	0.183	0.164	0.087
SSET ₁₆	0.170	0.258	0.259	0.207
GT ₂₉	0.125	0.154	0.182	0.159
SPA ₂₄	0.078	0.107	0.091	0.111
CTO ₁₀	0.261	0.255	0.221	0.193

Résumé

Dans le cadre de cette étude, nous avons discuté l'effet du stress thermique et celui du stress salin sur la croissance de 6 souches isolées de nodules racinaires de *Retama*, *Spartium*, *Calicotome*, *Genista*, *Cytisus* appartenant à la tribu de *Genisteeae*. Comparés à deux souches de référence.

Les résultats de cette étude montrent que la plupart des souches arrivent à pousser entre 26 °C et 34 °C et y en a même qui tolère à 36°C, le cas de l'espèce *Bradyrhizobiumalgeriense*RST89, d'autre part nous avons la souche type *Bradyrhizobiumjicamea*, qui n'appartienne pas à la tribu *Genisteeae*, à un optimum de croissance à 32°C.

En ce qui concerne l'effet de NaCl sur les souches étudiées, nous avons remarqué que la plupart des souches sont affectées par le NaCl, En outre la sensibilité de certaines souches au stress salin, elles continuent de pousser entre 200 et 400 mM. C'est le cas des souches GT29, CTO10 et SSET16. Et par rapport à la souche Ca59 c'est la qui continue sa croissance à une concentration de 400Mm.

Mot clé : *Bradyrhizobium*, symbiose, nodules racinaire, fixation d'azote.

Abstract

In this study, we discussed the effect of heat stress and that of salt stress on the growth of 6 isolated strains of root nodules of *Retama*, *Spartium*, *Calicotome*, *Genista*, *Cytisus* belonging to the tribe of *Genisteeae*. Compared to two reference strains.

The results of this study show that most strains manage to grow between 26 ° C and 34 ° C and some even tolerate at 36 ° C, the case of the species *Bradyrhizobiumalgeriense*RST89, on the other hand we have the strain *Bradyrhizobiumjicamea* type, which does not belong to the *Genisteeae* tribe, at optimum growth at 32 ° C.

Regarding the effect of NaCl on the strains studied, we noticed that most of the strains are affected by NaCl. Besides the sensitivity of some strains to salt stress, they continue to grow between 200 and 400 mM. This is the case with strains GT29, CTO10 and SSET16. And compared to the Ca59 strain, this is where it continues to grow at a concentration of 400Mm.

Keyword: *Bradyrhizobium*, symbiosis, root nodules, nitrogen fixation